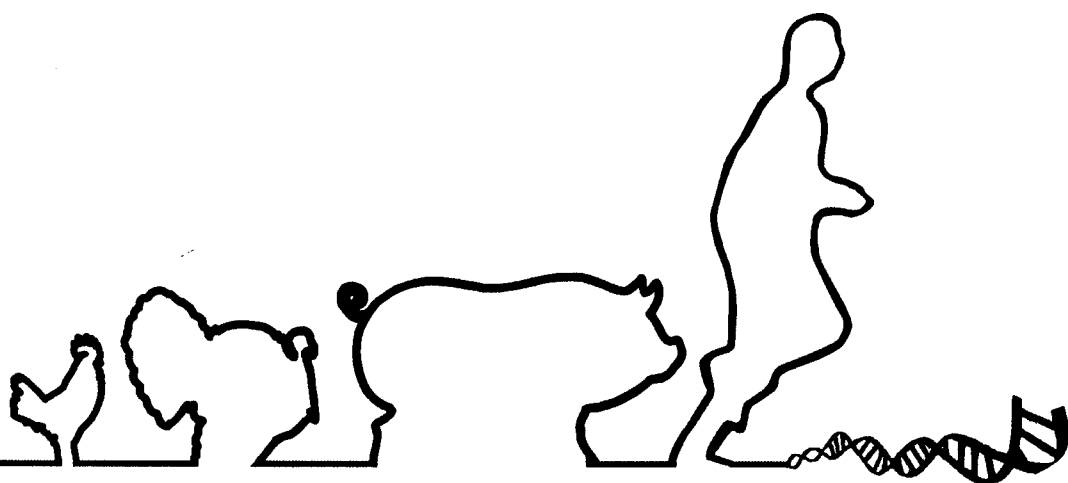


Patrícia Sofia Carneiro Antunes



**Epidemiologia da resistência
a agentes antimicrobianos em
Salmonella não tifóide**

Patrícia Sofia Carneiro Antunes

**Epidemiologia da resistência a agentes antimicrobianos
em *Salmonella* não tifóide**

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 09/09/2008
Reg. 6122
Cota

FFD

ANT

6122 ex.2



Laboratório de Microbiologia

2007

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Microbiologia
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Ao Zé Manel

Ao Vasco

“... We can ask who is faster: humans who want to eliminate bacterial pathogens or bacteria that continuously evolve to gain new niches.”

Velge *et al*, 2005

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Luísa Peixe, agradeço a total disponibilidade, a amizade, o apoio e incentivo constantes demonstrados ao longo dos últimos anos.

À Prof. Doutora Nazaré Pestana agradeço a amizade, os conselhos sábios e apoio constante, nomeadamente na microbiologia alimentar.

Ao Prof. Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa agradeço a oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Aos membros do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto agradeço toda a ajuda e disponibilidade presentes ao longo destes anos.

Ao meu Professor de Microbiologia, Prof. Doutor António Freitas da Fonseca, agradeço o acompanhamento e confiança depositada desde o início da minha carreira académica e por todos os ensinamentos que ficarão para sempre.

Aos membros do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto que me acompanharam ao longo da minha actividade docente agradeço a amizade e a ajuda ao longo destes anos.

Às pessoas da minha Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto agradeço a oportunidade de realização deste trabalho e todo o apoio demonstrado.

À Carla Novais e à Sandra Quinteira, minhas colegas de bancada ao longo desta caminhada de quase 10 anos, agradeço especialmente a amizade que demonstraram nos bons e maus momentos e toda a ajuda e disponibilidade inesgotáveis em fases cruciais deste trabalho.

Às companheiras mais recentes, Elisabete Machado, Ana Freitas e Filipa Grosso, agradeço a ajuda importante em determinados momentos.

Aos amigos, Cláudia Brandão, Miguel Monteiro e Jorge Oliveira, quero agradecer a contribuição em etapas importantes deste trabalho.

Aos familiares e amigos, agradeço a amizade e por entenderem as minhas ausências.

Aos meus pais agradeço todo o carinho, compreensão e disponibilidade que nunca falharam.

Ao meu marido Zé Manel e ao meu filho Vasco por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos. À Carolina sempre presente durante as longas horas de realização desta tese.

A todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a concretização desta tese.

Resumo

Salmonella não tifóide é considerado um dos agentes zoonóticos mais importante a nível mundial, frequentemente implicado em doenças de origem alimentar. A selecção de isolados apresentando diminuição de susceptibilidade a antibióticos, associada à utilização intensiva destes agentes em produção animal, tem vindo a constituir um desafio premente em saúde pública com importantes repercussões terapêuticas em medicina humana. Efectivamente, infecções humanas por *S. Typhimurium* DT104 com resistência múltipla, por estirpes produtores de β -lactamases de espectro alargado ou resistentes às fluoroquinolonas, transmitidas ao homem através da cadeia alimentar, têm sido crescentemente descritas. Contudo, não se encontra completamente esclarecido o contributo de clones bem adaptados a diferentes nichos ecológicos, assim como a presença de genes de resistência associados a unidades de captura genética (integrões, transposões e plasmídeos), para a resistência aos antibióticos, em *Salmonella*. Assim, tendo em consideração os problemas crescentes, a nível mundial, associados ao género *Salmonella*, aliada à escassez de dados portugueses disponíveis, pretendeu-se neste trabalho fazer o estudo epidemiológico da resistência a agentes antimicrobianos em isolados de *Salmonella* recolhidos em Portugal.

Foram incluídos neste estudo 1511 isolados obtidos entre 2002 e 2004 provenientes de várias origens, nomeadamente clínica humana (n=1057), alimentar [n=350 incluindo isolados de produtos derivados de aves (n=128), de porco (n=110) e de vaca (n=17), de alimentos de origens diversas (n=33) e alimentos desconhecidos (n=62)], ambiental (n=92) e de origem desconhecida (n=12). Procedeu-se à caracterização fenotípica e genotípica dos isolados e à caracterização molecular de genes de resistência e respectivas unidades de captura genética, de modo a explicar a disseminação da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em *Salmonella*.

O estudo da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos revelou a resistência a um ou mais antibióticos de diferentes famílias em 57% dos isolados, especialmente nos de origem alimentar. Os fenótipos mais frequentemente detectados incluíam resistência ao ácido nalidíxico (29%), geralmente associado a produtos avícolas, bem como à tetraciclina (25%), estreptomicina (22%), sulfametoxazole (22%) e ampicilina (21%), principalmente em produtos à base de porco. É de destacar a diminuição de susceptibilidade simultaneamente ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, observada em elevado número de isolados de origem humana e alimentar, pela possibilidade de insucessos terapêuticos em infecções invasivas por *Salmonella* em que estes agentes são geralmente utilizados. Adicionalmente, a elevada incidência (65%) de isolados de *Salmonella* com diminuição de susceptibilidade à nitrofurantoína, detectada durante os anos da chamada “crise dos nitrofuranos” (2002-2003), sugere que a utilização ilegal e indiscriminada desse grupo de antibióticos em Portugal, terá estado implicada na selecção e prevalência de elevado número de *S. Enteritidis* em alimentos de origem animal e, consequentemente, em humanos. Do mesmo modo, a emergência e persistência, a nível

nacional, de dois clones de *S. Typhimurium* com resistência múltipla (o clone DT104 e um outro produtor da β -lactamase OXA-30), disseminados em humanos e alimentos, poderá também estar relacionada com o uso intensivo destes antibióticos.

A caracterização molecular dos fenótipos de resistência observados permitiu identificar vários determinantes genéticos associados à resistência a diferentes antimicrobianos: β -lactâmicos (*bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30} e *bla*_{TEM}), aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2* e *aadA5* para estreptomicina; *aac(3)-IV* para gentamicina e *aphA1* para canamicina), fenicóis (*catA*, *floR* e *cmlA1*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*), tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)* e *tet(G)*], e trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA12* e *dfrA17*), tendo sido todos estes genes detectados em isolados de humanos e alimentos, principalmente nos de origem animal. Genes de resistência a agentes antimicrobianos de grande utilização em produção animal (sulfonamidas, estreptomicina, trimetoprim e ampicilina) foram frequentemente veiculados por integrões de classe 1, particularmente em isolados de *Salmonella* (principalmente *Typhimurium*) com resistência múltipla. Contudo, foi observada uma baixa diversidade deste tipo de integrões [gene *bla*_{PSE-1}, genes *aadA* (*aadA1*, *aadA2* e *aadA5*), isoladamente ou associados a outros que codificam resistência ao trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA12* e *dfrA17*) ou à produção de uma β -lactamase (*bla*_{OXA-30})]. É ainda de destacar, a presença de um gene recentemente caracterizado que confere resistência às sulfonamidas, o gene *sul3*, num *cluster* de genes, contendo elementos de inserção, localizado a jusante de três combinações diferentes de cassetes de genes de integrões de classe 1 atípicos (os genes *sul3* e *qacH* substituíram os genes *sul1* e *qacE Δ 1*, respectivamente, na região 3'CS), detectados em diferentes serótipos de *Salmonella* com resistência múltipla. Além disso, a maioria dos tipos de integrões de classe 1, típicos e atípicos, foram observados em clones do mesmo ou de diferentes serótipos, provenientes de áreas geográficas e origens diversas, sugerindo a disseminação de determinados elementos genéticos móveis em que se encontram inseridos. Para além da aquisição horizontal de genes que permitam a sobrevivência bacteriana, a incidência de *Salmonella* com resistência múltipla poderá estar relacionada com a capacidade de determinados clones persistirem em determinados nichos animais e resistirem às condições adversas do processamento alimentar. Com efeito, foi observado um reduzido número de clones com resistência múltipla, incluindo dois clones predominantes, *S. Typhimurium* DT104 e *S. Typhimurium* produtora de OXA-30, também frequentes a nível mundial ou ibérico, respectivamente.

Os resultados obtidos, para além de permitirem obter informação sobre a magnitude do problema da resistência em *Salmonella*, bem como sobre o seu contexto genético, sugerem a origem na produção animal das resistências observadas. Deste modo, os animais usados para consumo humano deverão ser considerados como reservatório de clones de *Salmonella* resistentes e de unidades de captura genética de transferência horizontal contendo frequentemente *clusters* de genes de resistência a antibióticos e desinfetantes, convertendo assim a cadeia alimentar, numa fonte importante de isolados com resistência múltipla em humanos.

Abstract

Non-typhoid *Salmonella* is one of the most important zoonotic agents world wide, being frequently implicated in food-borne diseases. The selection of antibiotic-resistant strains, along with intensive antibiotic-usage in animal production, constitutes a challenging public health issue with important therapeutic repercussions in human medicine. Indeed, there is a growing number of reports on food-borne human infections by multidrug-resistant *S. Typhimurium* DT104, by strains producing extended-spectrum β -lactamases, and by fluoroquinolone resistant *Salmonella*. Still, the contribution of clones well adapted to different ecological niches, as well as the presence of resistance genes associated with mobile genetic capture units (integrons, transposons and plasmids), to the antibiotic resistance in *Salmonella*, is not fully understood. Thus, considering the escalating world wide problems associated to the *Salmonella* genus, along with the scarcity of available Portuguese data, the aim of the present work was to perform the epidemiological study of resistance to antibiotics in *Salmonella* isolates obtained in Portugal.

The present study comprised 1511 *Salmonella* isolates, obtained between 2002 and 2004 and deriving from multiple origins, namely, human clinical sources (n=1057), food [n=350, including isolates from poultry (n=128), pork (n=110) and beef (n=17) products, miscellaneous food (n=33), and unknown food (n=62)], environmental (n=92), and of unknown origin (n=12). *Salmonella* isolates were phenotypically and genotypically profiled which included the molecular characterisation of resistance genes and their genetic capture units, in order to explain the dissemination of multiple antibiotic-resistance.

Antibiotic-susceptibility tests revealed the resistance to one or more classes of antibiotics in 57% of all isolates. Antibiotic resistance was particularly frequent in isolates from food origin. The most frequently detected phenotypes comprised resistance to nalidixic acid (29%), which was typically associated to poultry products, as well as resistance to tetracycline (25%), streptomycin (22%), sulfametoxazole (22%), and ampicillin (21%), mostly associated to pork-based products. Noteworthingly, in both human and food isolates, resistance to nalidixic acid was frequently associated with decreased susceptibility to ciprofloxacin, which may compromise treatment of invasive *Salmonella* infections, in which this drugs are commonly used. In addition, we observed a high incidence (65%) of *Salmonella* isolates with decreased nitrofurantoin susceptibility, detected during the years of the so-called "nitrofurantoin crisis" (2002-2003), which suggests that the illegal and indiscriminate use of these antibiotics in Portugal might have been implicated in the selection and prevalence of a high number of *S. Enteritidis* in food from animal origin, and consequently in humans. Similarly, we observed the emergence and persistence of two multidrug-resistant clones of *S. Typhimurium* (clone DT104 and another

producer of the OXA-30 β -lactamase), disseminated across the country in humans and food, which may also be related to the intensive use of nitrofurans.

The molecular characterization of the resistance phenotypes evidenced the presence of several genetic determinants associated to resistance to different antibiotics: β -lactams (*bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30}, and *bla*_{TEM}), aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2*, and *aadA5* for streptomycin; *aac(3)-IV* for gentamicin and *aphA1* for kanamycin), phenicols (*catA*, *floR*, and *cmlA1*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*, and *sul3*), tetracycline [*tet(A)*, *tet(B)*, and *tet(G)*], and trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA12*, and *dfrA17*). All these genes were detected in isolates from both humans and food, mainly of animal origin. Resistance genes to antimicrobial agents widely used in animal production (sulfonamides, streptomycin, trimethoprim and ampicillin) were often found in class 1 integrons, mainly in multidrug-resistant *Salmonella* isolates (predominantly Typhimurium). However, we observed a low diversity of integron types [gene *bla*_{PSE-1}, genes *aadA* (*aadA1*, *aadA2*, and *aadA5*) alone or associated with others encoding trimethoprim resistance (*dfrA1*, *dfrA12*, and *dfrA17*) or the production of a β -lactamase (*bla*_{OXA-30})]. Noteworthy, we have identified the recently characterised sulfonamide-resistance gene *sul3* in a cluster of genes containing insertion elements, localised downstream of three different combinations of atypical class 1 integrons gene cassettes (genes *sul3* and *qacH* replaced genes *sul1* and *qacEΔ1*, respectively, in the 3'CS region), detected in different serotypes of multidrug-resistant *Salmonella*. Furthermore, we found that both typical and atypical class 1 integrons were shared by several clones, of the same or different serotypes, deriving from diverse origins and geographic areas, suggesting the dissemination of certain mobile genetic elements in which these integrons were inserted. Beyond the horizontal acquisition of genes that allow bacterial survival, the incidence of multidrug-resistant *Salmonella* might be related to the ability of certain clones to persist in certain animal niches and to resist adverse conditions of food processing. In fact, we observed a reduced number of multidrug-resistant clones, including two predominant clones, *S. Typhimurium* DT104 and *bla*_{OXA-30}-producing *S. Typhimurium* clone, also frequently found world wide or in the iberian peninsula, respectively.

The present results, in addition to providing valuable information on the magnitude of the antibiotic resistance issue in *Salmonella* as well as its genetic context, suggest that its resistance profile is originated in the animal production setting. Therefore, animals used for human consumption should be considered as reservoirs of resistant *Salmonella* clones and of horizontally transferable genetic capture units often carrying clusters of genes conferring resistance to antibiotics and disinfectants, thus converting the food chain in an important source of multidrug-resistant isolates in humans.

Résumé

Salmonella non typhoïde est considéré un des agents zoonotiques plus important dans un niveau mondial, fréquemment impliqué aux maladies d'origine alimentaire. La sélection d'isolés présentant une diminution de susceptibilité à les antibiotiques, qui est associée à l'utilisation intensive de ces agents dans la production animale, constitue un constant défi pour la santé publique avec des importants répercussions thérapeutiques en médecine humaine. Effectivement, les infections humaines causées par *S. Typhimurium* DT104 avec multiple résistance, à souches productrices de β -lactamases de spectre élargi ou résistants aux fluoroquinolones, qui sont transmissibles à l'homme à travers de la chaîne alimentaire, deviennent de plus en plus décrites. En tous cas, on ne trouve pas complètement éclairé la contribution des clones bien adaptés aux différents niches écologiques, ainsi comme la présence des gènes de résistance qui sont associés aux unités de capture génétique (intégrons, transposons et plasmides), dans la résistance aux antibiotiques, en *Salmonella*. Ayant, considérer la croissance des problèmes dans un niveau mondial, associés au genre *Salmonella*, liée à la manque de données portugais disponibles, on a voulu dans ce travail faire une étude épidémiologique de la résistance aux agents antimicrobiens dans les isolés de *Salmonella* cueillis au Portugal.

Dans ce travail on a inclu 1511 isolés entre 2002 et 2004 provenant de plusieurs origines, à savoir la clinique humaine (n=1057), alimentaire [(n=350 inclu les isolés de produits parvenus des volaille (n=128), porc (n=110) et vache (n=17), des aliments de divers origines (n=33) e des aliments inconnus (n=62)], ambientale (n=92) et d'origine inconnue (n=12). On a fait une caractérisation phénotypique et génotypique des isolés et la caractérisation moléculaire des gènes de résistance et ces respectives unités de capture génétique, a fin d'expliquer la dissémination de la résistance aux plusieurs agents antimicrobiens en *Salmonella*.

L'étude de la susceptibilité aux agents antimicrobiens a révélé la résistance à un ou plus antibiotiques de différents familles en 57% des isolés, particulièrement d'origine alimentaire. Les phénotypes plus fréquemment détectés incluait la résistance à l'acide nalidixique (29%), lié aux produits de volaille, aussi comme à la tétracycline (25%), streptomycine (22%), sulfaméthoxazole (22%), et ampicilline (21%), particulièrement en produits fait de porc. Il faut remarquer la diminution de la susceptibilité au même temps à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine, observée dans un grand numéro d'isolés d'origine humaine et alimentaire, avec la possibilité d'insuccès thérapeutiques en infections envahissantes par *Salmonella* où ces agents sont utilisés. Additionnellement, l'incidence élevée (65%) d'isolés de *Salmonella* avec une diminution de susceptibilité à la nitrofurantoïne, détectée pendant les années de "la crise des nitrofuranes" (2002-2003), a suggère que l'utilisation illégale et a grand scale de ce groupe d'antibiotiques en Portugal, pourrait être impliqué dans la sélection et prévalence d'un grand numéro de *S. Enteritidis* en aliments d'origine animale et, conséquemment, en humains. De la même façon, l'émergence et persistance de deux clones de *S. Typhimurium* avec multiple

résistance (le clone DT104 est un producteur de la β -lactamase OXA-30), disséminés en humains et aliments, pourrait aussi être lié avec l'usage intensif de ces antibiotiques.

La caractérisation moléculaire des phénotypes de résistance observés a permis d'identifier plusieurs déterminants génétiques associés à la résistance aux différents antimicrobiens: β -lactamiques (*bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30} et *bla*_{TEM}), aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2* et *aadA5* pour l' streptomycine; *aac(3)-IV* pour la gentamycine et *aphA1* pour la kanamycine), fénicols (*catA*, *floR* et *cmlA1*), sulfonamides (*sul1*, *sul2* et *sul3*), tétracycline [*tet(A)*, *tet(B)* et *tet(G)*], et triméthoprim (*dfrA1*, *dfrA12* et *dfrA17*), tous ces gènes détectés dans des isolés d'humains et des aliments, surtout dans ceux d'origine animale. Les gènes de résistance aux agents antimicrobiens de grande usage à la production animale (sulfonamides, streptomycine, triméthoprim et ampicilline) ont été fréquemment véhiculés à travers des intégrons de classe 1, particulièrement en isolés de *Salmonella* (surtout Typhimurium) avec de multiple résistance. Pourtant, il y a été observé une faible diversité de ce genre de intégrons [gène *bla*_{PSE-1}, gènes *aadA* (*aadA1*, *aadA2* et *aadA5*) d'une façon isolée ou liés à d'autres qui codifient la résistance au triméthoprim (*dfrA1*, *dfrA12* et *dfrA17*) ou à la production d'une β -lactamase (*bla*_{OXA-30})]. Il est important de souligner, la présence d'un gène récemment caractérisé qui donne de résistance aux sulfonamides, le gène *sul3*, dans un *cluster* de gènes, qui contient des éléments d'insertion, localisé à la suite de trois différentes combinaisons de cassettes de gènes de intégrons de classe 1 atypiques (les gènes *sul3* et *qacH* ont remplacé les gènes *sul1* et *qacE Δ 1*, respectivement, dans la région 3'CS), détectés en différents sérotypes de *Salmonella* avec multiple résistance. La majorité des types de intégrons de classe 1, typiques et atypiques, ont été observés en clones du même ou de différents sérotypes, provenant des régions géographiques et origines divers, en suggérant la dissémination de certains éléments génétiques mobiles où se trouvent insérés. Au-delà de l'acquisition horizontale des gènes qui permettent la survie bactérienne, l' incidence de *Salmonella* avec une multiple résistance pourra être liée à la capacité de certains clones de persister en des certaines niches d' animaux et résister à des conditions hostiles pendant la production d'aliments. En effet, il y a été observé un réduit nombre des clones avec de résistance multiple, contenant deux clones prédominants, *S. Typhimurium* DT104 et *S. Typhimurium* producteur de OXA-30, aussi fréquents à niveau mondial ou ibérique, respectivement.

Les résultats obtenus, au-delà de permettre obtenir information sur l'amplitude du problème de la résistance en *Salmonella*, aussi bien sur son contexte génétique, suggèrent l'origine à la production animale des résistances observées. Ainsi, les animaux utilisés pour la consommation humaine devront être considérés comme un réseau de clones de *Salmonella* résistants et des unités de capture génétique de transférence horizontale contenant fréquemment des *clusters* des gènes de résistance aux antibiotiques et désinfectants, ce qui transforme la chaîne alimentaire dans une importante source d'isolés avec de multiple résistance aux humains.

Índice

1. Introdução Geral	1
1.1. <i>Salmonella</i> não tifóide: patogénico emergente	3
1.1.1. Dados epidemiológicos e vigilância	3
1.1.2. Problemas emergentes e consequências para a saúde pública	5
1.2. Resistência a agentes antimicrobianos em <i>Salmonella</i>	7
1.2.1. Uso de agentes antimicrobianos em animais de consumo	7
1.2.2. Origem da resistência em <i>Salmonella</i>	9
1.2.3. Problemas emergentes associados à resistência em <i>Salmonella</i>	10
1.3. Ocorrência de resistência em <i>Salmonella</i> : disseminação de clones e unidades de captura genética	14
1.3.1. Disseminação clonal	14
1.3.2. Disseminação associada a unidades de captura genética	15
1.3.3. Resistência aos diferentes grupos de antimicrobianos	22
1.4. Objectivos	32
1.5. Lista de trabalhos que integram a tese	33
1.6. Referências bibliográficas	34
2. Epidemiologia da resistência a agentes antimicrobianos em <i>Salmonella</i> não tifóide de várias origens	45
2.1. <i>Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in Portuguese Salmonella enterica isolates from different sources</i>	47
2.2. <i>Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis?</i>	61
2.3. <i>Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2 and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons</i>	65
2.4. <i>Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and class 2 integrons in Salmonella enterica isolates from different sources in Portugal</i>	71
2.5. <i>Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a Salmonella typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 β-lactamase</i>	81
2.6. <i>Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among Salmonella isolates</i>	89
3. Conclusão Geral	95
4. Anexos	103
I. Material e Métodos	105
1. Isolados	105

2. Ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos	106
2.1. Método de diluição em agar	106
2.2. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos β -lactâmicos e da expressão das β -lactamases	106
2.2.1. Método de difusão em agar com discos / prova da acção sinérgica de dois discos	106
2.2.2. Método de difusão em agar com tiras (E-test)	107
2.2.3. Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases	107
3. Caracterização de genes de resistência a antibióticos	108
3.1. Condições gerais das reacções de amplificação de DNA por PCR	108
3.1.1. Obtenção de DNA total	108
3.1.2. Condições de amplificação	109
3.1.3. Electroforese em gel de agarose	109
3.1.4. Purificação dos produtos de amplificação	109
4. Detecção e caracterização de integrões de classe 1 e de classe 2	109
4.1. Detecção de integrões	109
4.2. Tipagem de integrões	110
5. Detecção e caracterização de integrões atípicos	111
6. Estudo da relação clonal	111
6.1. Preparação do DNA para PFGE	111
6.2. Separação dos fragmentos de DNA por PFGE	112
6.3. Visualização e interpretação do perfil electroforético obtido por PFGE	112
7. Estudo da transferência da resistência	113
7.1. Ensaios de conjugação	113
7.2. Análise plasmídica	113
7.2.1. Extracção de DNA plasmídico	113
7.2.1.1. Metodologias convencionais	113
7.2.1.2. Metodologias rápidas (kits comerciais)	114
7.2.1.3. Electroforese em gel de agarose	115
7.2.2. Perfis de restrição dos plasmídeos (RFLP)	115
7.2.3. Técnica S1-PFGE e hibridação de sondas de DNA	115
8. Referências bibliográficas	121

II. Sequências submetidas ao Genbank **123**

1. <i>Salmonella typhimurium</i> class 1 integron beta-lactamase (<i>blaOXA-30</i>) and aminoglycoside 3'-(9)-O-adenyltransferase (<i>aadA1</i>) genes, complete cds (AY534545)	123
2. <i>Salmonella typhimurium</i> strain IH184/03 class 1 integron integrase (<i>intI1</i>) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (<i>dfrA12</i>), putative protein, aminoglycoside adenyltransferase (<i>aadA2</i>), chloramphenicol-resistance protein (<i>cmlA1</i>), aminoglycoside adenyltransferase (<i>aadA1</i>), quaternary ammonium compound-resistance protein (<i>qacH</i>), and transposase (<i>tnp</i>) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (<i>sul3</i>) gene, partial cds (EF051037)	125

3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Rissen* strain *BF128* class 1 integron integrase (*intI1*) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (*dfrA12*), unknown protein, aminoglycoside adenytransferase (*aadA2/1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds (EF051038) 130
4. *Salmonella typhimurium* strain *BF272* class 1 integron, partial sequence; putative esterase (*estX*), phosphoserine phosphatase (*psp*), aminoglycoside adenytransferase (*aadA2*), chloramphenicol-resistance protein (*cmlA1*), aminoglycoside adenytransferase (*aadA1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds (EF051039) 134

Lista de Figuras

Capítulo 1

1.2.2 Figura 1: Resistência e resistência múltipla (≥ 4 agentes) a agentes antimicrobianos em <i>Salmonella</i> não tifóide entre 2000 e 2004 (<i>Enter-net</i> , 2006)	9
1.3.2 Figura 2: Representação esquemática de um integrão de classe 1	17
1.3.2 Figura 3: Representação esquemática de um integrão de classe 1 complexo	17
1.3.2 Figura 4: Organização do <i>cluster</i> de genes da região de resistência múltipla da SGII de <i>S. Typhimurium</i> DT104	19

Capítulo 2

2.3. Figure 1: PFGE patterns of <i>sul3</i> -carrying <i>Salmonella</i> isolates	68
2.4. Figure 1: Representative PFGE patterns of <i>Salmonella</i> isolates with integrons	77
2.5. Figure 1: Restriction patterns of DNA plasmids isolated from <i>E. coli</i> transconjugants	85
2.5. Figure 2: PFGE patterns of four <i>Salmonella typhimurium</i> isolates	86
2.6. Figure 1: Organization of the three types of <i>sul3</i> -carrying integrons in <i>Salmonella</i>	92

Lista de Tabelas

Capítulo 1

1.2.3 Tabela 1: Valores de resistência a agentes antimicrobianos em diferentes serótipos de <i>Salmonella</i> não tifóide registados na Europa no ano 2000 (adaptado de Threlfall <i>et al</i> , 2003)	11
1.3.2 Tabela 2: Epidemiologia das variantes de SGI1	20
1.3.3 Tabela 3: Epidemiologia das β -lactamases que conferem resistência a cefalosporinas de largo espectro em <i>Salmonella</i>	23
1.3.3 Tabela 4: Epidemiologia dos genes <i>qnr</i> em <i>Salmonella</i>	26

Capítulo 2

2.1. Table 1: Prevalence of antimicrobial resistance genes among <i>Salmonella</i> isolates	58
2.2. Table 1: MICs of nitrofurantoin for <i>Salmonella</i> isolates from different sources	63
2.3. Table 1: Distribution of sulfonamide resistance genes in <i>Salmonella</i> isolates and relation to class 1 and class 2 integrons	67
2.3. Table 2: Characterization of <i>Salmonella</i> isolates with the <i>sul3</i> gene	67
2.4. Table 1: Primer sequences for PCR assays used in the study	73
2.4. Table 2: Frequency of antimicrobial resistance in <i>Salmonella</i> isolates from different sources	74
2.4. Table 3: Distribution of class 1 integrons among <i>Salmonella</i> isolates from different sources	75
2.4. Table 4: Distribution of class 1 integrons among <i>Salmonella</i> isolates of different serotypes	75
2.4. Table 5: Integrons, antimicrobial resistance profiles and PFGE types of <i>Salmonella</i> serotypes isolates from humans, foods and the environment during 2002-2003	76
2.5. Table 1: Epidemiological information for the <i>S. typhimurium</i> isolates used in this study	83
2.5. Table 2: Antimicrobial susceptibility profiles of <i>S. typhimurium</i> isolates and transconjugants	84
2.6. Table 1: Characteristics of the <i>sul3</i> -producing <i>Salmonella</i> isolates used in this study	91

Capítulo 4

I. Tabela 1: Descrição dos primers, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reacções de PCR	117
I. Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de PCR	119
I. Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de sequenciação	120

Capítulo 1

Introdução geral

1.1) *Salmonella* não tifóide: patogénico emergente

1.1.1) Dados epidemiológicos e vigilância

A transmissão de *Salmonella*¹ não tifóide das populações animais ao Homem através da cadeia alimentar, particularmente através de alimentos de origem animal, continua a ser um problema importante de saúde pública traduzindo-se frequentemente em infecção humana (Angulo *et al*, 2000; Hohmann, 2001; Rabsch *et al*, 2001; Threlfall, 2002; Helms *et al*, 2005; EFSA, 2006). Estas infecções manifestam-se geralmente como situações agudas, gastroenterites, habitualmente auto-limitadas e caracterizadas por diarreia, febre e dores abdominais (Angulo *et al*, 2000; Hohmann, 2001). No entanto, apesar de menos frequentes, as infecções por estas estirpes podem evoluir para uma infecção sistémica, principalmente em crianças, idosos e imunosuprimidos, resultando em doença grave que pode levar à morte, sendo necessário e essencial um tratamento eficaz com agentes antimicrobianos (Angulo *et al*, 2000; Hohmann, 2001; Vugia *et al*, 2004).

A incidência dos casos de salmonelose humana parece não estar a decrescer significativamente, apesar de todos os esforços para a redução das doenças transmitidas por alimentos (Rabsch *et al*, 2001; Helms *et al*, 2005). Efectivamente, nos Estados Unidos da América (EUA), a salmonelose constitui cerca de metade dos surtos associados a etiologia bacteriana (Lynch *et al*, 2006), sendo cerca de 30 a 40 mil casos humanos de salmonelose anualmente registados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), embora as estimativas apontem para que *Salmonella* seja responsável por 1,4 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar (Mead *et al*, 1999). Na Europa, *Salmonella* é um dos agentes predominantes das doenças transmitidas por alimentos, com quase 193 mil casos e 74% dos surtos registados em 2004, sendo a sua aquisição associada principalmente ao consumo de produtos avícolas (EFSA, 2006). Em Portugal, de acordo com os dados do Programa de Vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMS), a salmonelose foi a doença de origem alimentar

¹ O género *Salmonella* inclui apenas duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A maioria dos membros do género *Salmonella* pertence à espécie *S. enterica*, que por sua vez é dividida em seis subespécies, sendo a mais importante a subespécie I, *S. enterica* subsp. *enterica*, por incluir as estirpes patogénicas para o Homem, sendo os serogrupos mais comuns A, B, C1, C2, D e E. As várias subespécies podem ser divididas em serótipos, que incluem diferentes fagotipos (Brenner *et al*, 2000; Velge *et al*, 2005). Neste trabalho é utilizada a nomenclatura proposta pelo CDC, baseada em recomendações da OMS, em que a seguir ao género o nome dos serótipos inicia-se por letra maiúscula e aparece sem itálico (Brenner *et al*, 2000).

mais frequente, representando 37% do total de surtos investigados e sendo responsável por 20% dos casos notificados entre 1999 e 2000 (WHO, 2003).

A epidemiologia da salmonelose é dominada por apenas alguns serótipos² de *Salmonella* não tifóide (Velge *et al*, 2005). Aqueles mais frequentemente associados com infecção humana na Europa têm sido *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, correspondendo em 2004 a 76% e 14% dos casos registados, respectivamente (EFSA, 2006). Nos EUA, dados de 2004, demonstram que aproximadamente 50% dos casos humanos de salmonelose registados pelo CDC foram causados por três serótipos, *S. Typhimurium* (19,2%), *S. Enteritidis* (14,1%) e *S. Newport* (9,3%) (CDC, 2005a). *S. Enteritidis* é normalmente associada a aves e a produtos avícolas, enquanto *S. Typhimurium* tem uma gama de hospedeiros mais ubíqua, sendo associada a suínos, bovinos, para além de aves e ovelhas (Threlfall, 2002).

O facto de apenas alguns serótipos serem frequentemente associados com infecção humana, embora sejam reconhecidos mais de 2500 serótipos de *Salmonella* (Velge *et al*, 2005), determina que a serotipagem seja pouco informativa no estudo epidemiológico desta doença. Assim, métodos de tipagem mais discriminatórios, tais como a fagotipagem e a electroforese em campo pulsado (PFGE), são usados habitualmente em conjunto com a serotipagem pelos sistemas nacionais e internacionais de vigilância da salmonelose, como o *Enter-Net* (*The International Surveillance Network for Enteric Infections*) na Europa (Fischer, 1999; Peters *et al*, 2003) e o *PulseNet* nos EUA (Swaminathan *et al*, 2001; Gerner-Smidt *et al*, 2006). No entanto, em determinadas situações estes métodos de tipagem podem apresentar limitações em termos de capacidade de discriminação, nomeadamente na vigilância de serótipos ou clones de *Salmonella* que apresentam uma grande homogeneidade genética, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* DT104. De forma a contornar estas limitações, têm, recentemente, sido propostos vários métodos alternativos, nomeadamente o *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) e o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Sukhnanand *et al*, 2005; Gerner-Smidt *et al*, 2006).

Uma vez que, na União Europeia, as infecções zoonóticas humanas mais frequentemente registadas são as causadas por bactérias associadas a animais de produção (EFSA, 2006) é de crucial importância a implementação de programas de

² A serotipagem de *Salmonella* baseia-se na caracterização dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), permitindo a classificação em serótipos, segundo o esquema de Kauffmann-White (Brenner *et al*, 2000).

monitorização de zoonoses e dos agentes zoonóticos (Directiva 2003/99/EC). A legislação Europeia relativa a higiene alimentar e controlo de zoonoses inclui disposições com o objectivo de controlar patogénicos de transmissão alimentar, tais como *Salmonella*, que existam em reservatórios animais importantes (Regulamento 2160/2003/EC). Por exemplo, na Finlândia, Suécia e Noruega foi possível já verificar que a implementação de programas de controlo de infecções zoonóticas humanas se reflectiu na redução da prevalência de *Salmonella* em carne de aves, suínos e bovinos (EFSA, 2006).

1.1.2) Problemas emergentes e consequências para a saúde pública

Nos últimos anos, grandes alterações ocorreram na epidemiologia da salmonelose, decorrentes, provavelmente, de transformações associadas à criação animal, que incluem a produção intensiva e a globalização do comércio de animais e produtos alimentares (Rabsch *et al*, 2001; Helms *et al*, 2005). Assim, é importante destacar não só o **aumento da incidência de determinados serótipos**, mas também a **emergência e disseminação de estirpes resistentes a antibióticos**.

É sugerido por alguns autores que o aumento substancial da incidência de infecções de origem alimentar causadas por *S. Enteritidis*, nos anos 90, conhecida como a pandemia da *S. Enteritidis*, e associada fundamentalmente ao consumo de aves e de ovos (Rabsch *et al*, 2001; Velge *et al*, 2005; EFSA, 2006), tenha sido consequência da erradicação, no início do séc. XX, de *S. Gallinarum* em aves, o que permitiu a *S. Enteritidis* ocupar esse nicho ecológico (Rabsch *et al*, 2001). Em muitos países europeus, *S. Enteritidis* encontra-se largamente disseminada na produção avícola (EFSA, 2004), incluindo Portugal, tendo Antunes *et al* (2003) verificado que 44% dos isolados de *Salmonella* em amostras de aves de venda a retalho eram do serótipo Enteritidis. Salienta-se também que a distribuição dos fagotipos de *S. Enteritidis* se alterou significativamente nos últimos anos na Europa. De facto, assistiu-se a um declínio da incidência do fagotipo PT4 (60% em 1998 para 30% em 2004), normalmente associado a infecções humanas, conjuntamente com a emergência de outros fagotipos, como PT1, PT8, PT14b e PT21 (*Enter-net*, 2006). Esta alteração na epidemiologia de *S. Enteritidis* requer clarificação, nomeadamente no que se refere a reservatórios destes fagotipos, veículos de contaminação e outros factores (ex. turismo e importação de alimentos e/ou animais) que poderão estar a proporcionar a proliferação e

circulação destas estirpes na Europa, substituindo o nicho biológico previamente ocupado por *S. Enteritidis* PT4 (Fisher, 2004).

Por outro lado, a emergência e disseminação epidémica de várias estirpes de *S. Typhimurium* resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, registada desde os anos 60 na Europa, parece estar associada à utilização de antibióticos na produção animal intensiva, tendo assim contribuído para a persistência de estirpes resistentes nas populações animais (Rabsch *et al*, 2001; Threlfall, 2002; Velge *et al*, 2005; EFSA, 2006). Actualmente, salienta-se a emergência internacional de *S. Typhimurium* DT104 com resistência múltipla, ocorrida em vários países desenvolvidos e responsável pelo aumento substancial de infecções por este serótipo (Rabsch *et al*, 2001; Helms *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005). O facto destas estirpes poderem, em determinadas situações, apresentar resistências cruzadas a antibióticos com interesse clínico, como as quinolonas, constitui um problema grave de saúde pública (Threlfall, 2000; Helms *et al*, 2005).

Recentemente, outras estirpes de *Salmonella* resistentes a antibióticos com características epidémicas têm sido registadas em vários países, nomeadamente *S. Newport* resistente a cefalosporinas, nos EUA, e *S. Paratyphi* B dT+ (antiga *S. Java*) com múltipla resistência, em vários países Europeus (Butaye *et al*, 2006). A epidemiologia da resistência a agentes antimicrobianos em *Salmonella* não se encontra completamente clarificada, pois apesar do papel importante da pressão selectiva causada pelo uso de antibióticos, outros factores deverão ser eventualmente considerados como contributo para uma melhor adaptação e disseminação destas estirpes em determinados ambientes e/ou hospedeiros (Butaye *et al*, 2006; Kang *et al*, 2006). Veja-se como exemplo o caso da disseminação epidémica de *S. Enteritidis*, uma das causas mais frequentes de salmonelose humana, associada a estirpes geralmente consideradas susceptíveis a todos os antibióticos (Butaye *et al*, 2006).

1.2) Resistência a agentes antimicrobianos em *Salmonella*

Embora o recurso a agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções humanas por *Salmonella* não tifóide não seja habitualmente recomendado nos casos ligeiros ou moderados em indivíduos saudáveis, a antibioterapia deve ser iniciada nos doentes com infecção grave e naqueles com factores de risco para infecção extraintestinal (Hohmann, 2001). Actualmente, as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração são os agentes escolhidos para o tratamento de salmoneloses invasivas em adultos e crianças, respectivamente (Angulo *et al*, 2000; Hohmann, 2001). O uso de outros agentes antimicrobianos, tais como ampicilina e trimetoprim/sulfametoxazol, utilizados tradicionalmente para o tratamento destas infecções, está limitado devido à emergência de estirpes resistentes (Angulo *et al*, 2000; Hohmann, 2001).

A transmissão através da cadeia alimentar de bactérias patogénicas resistentes a antibióticos, como as do género *Salmonella*, pode determinar consequências adversas para a saúde humana, tais como insucessos terapêuticos, doença invasiva, hospitalização e mortalidade (Helms *et al*, 2002, 2004; Angulo *et al*, 2004; Varma *et al*, 2005a, 2005b). Veja-se como exemplo, um surto, descrito na Dinamarca, causado por uma estirpe de *S. Typhimurium* DT104 com resistência múltipla, incluindo às quinolonas, transmitida por suínos ao Homem, e que resultou em 25 casos, na hospitalização de 11 pessoas com desfecho fatal para duas delas (Molbak *et al*, 1999). Adicionalmente, Helms *et al* (2004) verificaram que a infecção por estirpes de *S. Typhimurium* resistentes às quinolonas está associada com um risco três vezes maior de doença invasiva ou morte, comparativamente com o observado com estirpes susceptíveis.

1.2.1) Uso de agentes antimicrobianos em animais de consumo

A resistência aos agentes antimicrobianos tornou-se um problema global de saúde pública com impacto directo na segurança alimentar (McDermott *et al*, 2002; Swartz, 2002; EFSA, 2006). O uso banalizado destas moléculas na produção animal conduz não só ao aparecimento de bactérias patogénicas e comensais resistentes a agentes antimicrobianos (Teuber, 2001; McDermott *et al*, 2002; McEwen & Fedorka-Cray, 2002), mas também à persistência de resíduos de medicamentos veterinários, potencialmente perigosos, nos alimentos de origem animal (Anadón & Martínez-Larrañaga, 1999). Embora estudos epidemiológicos sugiram que o uso de antibióticos

nos animais de produção pode ser responsável por infecções humanas causadas por bactérias resistentes, o debate sobre o uso de antibióticos em produção animal e subsequentes implicações na saúde humana continua, não existindo consenso completo sobre esta matéria (McDermott *et al*, 2002; McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Swartz, 2002; Phillips *et al*, 2004).

Actualmente, a produção intensiva de animais depende ainda fortemente do uso de agentes antimicrobianos, quer na profilaxia e tratamento de infecções, quer ainda, em alguns países, como promotores de crescimento (Van den Bogaard & Stobberingh, 1999; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; McDermott *et al*, 2002; McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Estima-se que cerca de 50% de mais de um 1 milhão de toneladas de antibióticos libertados na biosfera durante os últimos 50 anos estejam relacionados com actividades veterinárias (Teuber, 2001). Dados de um estudo europeu efectuado pela *European Federation of Animal Health* (FEDESA) mostraram que o volume de vendas de antibióticos em 1997 foi de 10493 toneladas de princípio activo que podem dividir-se em 52% para uso humano, 33% na saúde animal e 15% como promotores de crescimento (EMEA, 1999; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Em Portugal, dados do mesmo estudo indicam que cerca de 68 toneladas de antibióticos foram usados em animais (EMEA, 1999; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Mais recentemente, os dados fornecidos pela FEDESA, relativos a 1999, indicam que ocorreu um declínio no uso de antibióticos na produção animal (35%) comparado com o uso em humanos (65%), podendo estar relacionado com as restrições progressivas impostas à utilização de promotores de crescimento na União Europeia (Kümmerer, 2003). Na Directiva 70/524/CEE e suas posteriores modificações expõem-se as disposições legislativas em relação aos aditivos usados na alimentação animal. A lista de antibióticos usados como promotores de crescimento foi sendo aumentada na maioria dos países da União Europeia, no entanto, desde 1997 passou a conter unicamente quatro substâncias (flavofosfolipol, avilamicina, monensina e salinomycin), sendo entretanto aprovada a sua total proibição a partir de 2006. Relativamente aos antimicrobianos para uso terapêutico em espécies animais produtoras de géneros alimentícios, apenas podem beneficiar de uma autorização os medicamentos cujas substâncias activas constem do Regulamento 2377/90/CEE e suas posteriores modificações. Os agentes antimicrobianos mais frequentemente usados em produção animal pertencem aos grupos dos β -lactâmicos, tetraciclins, macrólidos, aminoglicosídeos e sulfonamidas (McDermott *et al*, 2002). Nas estimativas do volume de vendas de antibióticos para uso

veterinário, em 1997, na União Europeia, destacam-se as tetraciclinas (66%), macrólidos (12%), penicilinas (9%), aminoglicosídeos (4%), trimetoprim/sulfonamidas (2%), fluoroquinolonas (1%) e outras classes (5%) (EMEA, 1999; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

A possibilidade de estirpes e genes implicados na resistência serem seleccionados na produção animal e posteriormente atingirem o Homem determinou a implementação de programas de vigilância que permitem a monitorização da evolução da resistência a agentes antimicrobianos em bactérias zoonóticas e comensais. A emergência de bactérias resistentes e patogénicas para o Homem, com reservatórios animais, levou a que os isolados de *Salmonella* não tifóide fossem seleccionados como uns dos microrganismos “sentinela” em programas de vigilância em países da União Europeia (ex. DANMAP, *The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*) e nos EUA (ex. NARMS, *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

1.2.2) Origem da resistência em *Salmonella*

O aumento de estirpes de *Salmonella* com resistência a agentes antimicrobianos verificado nas últimas décadas tem vindo a constituir um desafio premente em saúde pública com importantes repercussões terapêuticas em medicina humana (Threlfall, 2002; Fluit, 2005). Efectivamente, dados do programa internacional de vigilância *Enter-net* (2006) mostram que o número de isolados de *Salmonella* não tifóide resistentes aumentou significativamente de 52,3% para 61,3% entre 2000 e 2004 (**Figura 1**).

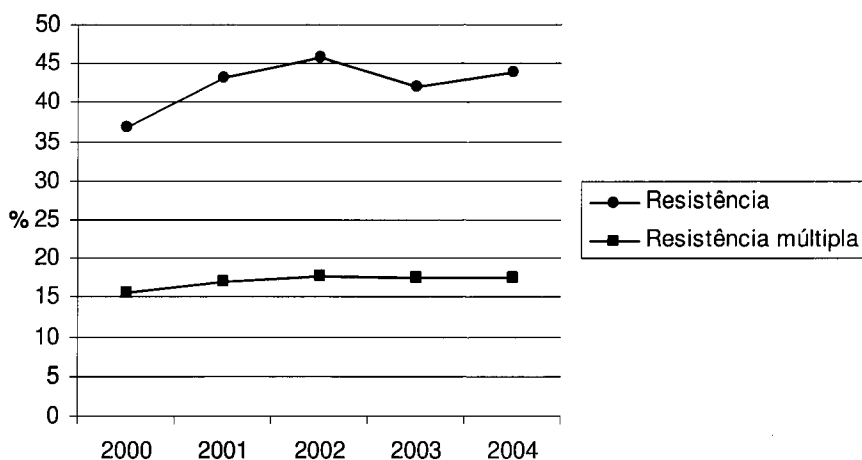


Figura 1: Resistência e resistência múltipla (≥ 4 agentes) a agentes antimicrobianos em *Salmonella* não tifóide entre 2000 e 2004 (*Enter-net*, 2006)

Nos países desenvolvidos, aceita-se que a as estirpes de *Salmonella* não tifóide adquirem a sua resistência nos hospedeiros animais antes de ocorrer a sua transmissão ao Homem pela cadeia alimentar ou por contacto directo com animais (WHO, 1997; Angulo *et al*, 2000; Threlfall, 2002). De facto, a pressão selectiva verificada nos humanos é baixa, pois o uso de antibióticos na terapêutica da salmonelose é pouco frequente, além de que a transmissão pessoa-a-pessoa é rara nos países industrializados (Arlet *et al*, 2006). Várias evidências suportam a teoria de que a resistência a agentes antimicrobianos em estirpes de *Salmonella* isoladas de humanos resulta do uso dessas substâncias em animais de consumo: **i)** estudos epidemiológicos e moleculares de casos e surtos de salmonelose humana associados a contacto directo entre animais e humanos ou a ingestão de produtos alimentares de origem animal contaminados com *Salmonella* resistente a múltiplos agentes antimicrobianos, incluindo a cefalosporinas de largo espectro e quinolonas (Holmberg *et al*, 1984; Molbak *et al*, 1999; Fey *et al*, 2000; White *et al*, 2001; CDC, 2002; Hendriksen, *et al*, 2004; CDC, 2005b); **ii)** padrões de resistência aos antimicrobianos observados em isolados de indivíduos com infecções por *Salmonella* se correlacionarem mais com os antibióticos usados na produção animal do que com os usados no tratamento dessas infecções em humanos (Angulo *et al*, 2000) e **iii)** associações temporais entre o uso e o aparecimento de resistências (Angulo *et al*, 2000; Swartz, 2002; Angulo *et al*, 2004), como verificado após a introdução de apramicina, licenciada para uso veterinário nos anos 80, e a emergência de *S. Typhimurium* DT204c resistente à gentamicina em humanos no Reino Unido (Carattoli, 2003).

Na União Europeia, a resistência aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* encontra-se largamente disseminada, principalmente nos reservatórios animais e alimentares, que constituem a fonte de transmissão ao Homem (EFSA, 2006). Em Portugal, Antunes *et al* (2003) descreveram a presença de 75% de isolados de *Salmonella* resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos obtidos de produtos avícolas, disponíveis para consumo humano, entre 1999 e 2000.

1.2.3) Problemas emergentes associados à resistência em *Salmonella*

Nos últimos anos, ocorreram grandes alterações nos padrões de resistência aos agentes antimicrobianos em *Salmonella* não tifóide (Threlfall, 2002; Parry, 2003). Nos anos 80, eram considerados microrganismos “susceptíveis”, tendo sido registado a partir dos anos 90 um aumento de isolados com resistência à ampicilina, cloranfenicol e

trimetoprim/sulfametoxazol (Hohmann, 2001). *S. Enteritidis* é um caso especial, uma vez que sendo uma das causas mais prevalentes de salmonelose humana, é um dos serótipos com menos resistências detectadas, sendo em geral considerado susceptível a todos os antibióticos (Butaye *et al*, 2006). Efectivamente, dados do programa internacional de vigilância *Enter-net* (Threlfall *et al*, 2003) relativos a países europeus mostram que a resistência a múltiplos agentes foi mais comum em isolados de *S. Typhimurium* relativamente a *S. Enteritidis* (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores de resistência a agentes antimicrobianos em diferentes serótipos de *Salmonella* não tifóide registados na Europa no ano 2000 (adaptado de Threlfall *et al*, 2003)

Serótipo	n° isolados	% resistência				
		0	1	2	3	≥ 4 agentes
Enteritidis	14636	71	24	2	1	2
Typhimurium	6777	23	14	8	4	51
Hadar	622	21	4	14	24	37
Virchow	449	28	27	4	4	36
Infantis	439	79	9	4	4	5
Newport	243	79	9	4	4	5
Blockley	229	49	10	3	10	25
Agona	206	87	7	3	2	0,5
Heidelberg	175	57	19	4	6	14
Brandenburg	160	63	26	6	4	1
Outros	3123	65	19	4	3	18
Total	27059	57	19	4	3	18

Desde os anos 60 que, no Reino Unido, existem registos de resistência múltipla em isolados de *S. Typhimurium* (Threlfall, 2000, 2002), apesar de só na década de 90 surgir o primeiro problema à escala mundial com a emergência e disseminação de *S. Typhimurium* **DT104 resistente a múltiplos antibióticos**, como ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (fenótipo ACSSuT) (Threlfall, 2000, 2002; Cloeckert *et al*, 2001; Rabsch *et al*, 2001; Helms *et al*, 2005). Esta estirpe foi identificada nos anos 80 no Reino Unido, tornando-se epidémica em gado bovino e posteriormente comum noutras espécies animais (aves, suínos e ovelhas), sendo as infecções humanas associadas com o consumo de vários tipos de alimentos de origem animal (ex. frango, carne de vaca, enchidos de porco) (Threlfall, 2000, 2002).

Um estudo recente sobre as infecções por *S. Typhimurium* DT104 demonstra que o número de casos tem aumentado em todo o mundo (Helms *et al*, 2005).

Actualmente, é preocupante a emergência de resistência a antibióticos fundamentais na terapêutica da salmonelose, tais como as fluoroquinolonas e cefalosporinas de largo espectro, podendo assim comprometer o tratamento de infecções graves por *Salmonella* (Hohmann, 2001; Threlfall, 2002; Helms *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005). Nomeadamente, no que diz respeito ao isolamento de *Salmonella* com **diminuição de susceptibilidade à ciprofloxacina** sugere-se que tenha sido consequência do uso de fluoroquinolonas nos animais, a partir dos anos 90 (Threlfall, 2002; Angulo *et al*, 2004). Após a introdução da enrofloxacin, na produção animal, verificou-se em vários países a emergência de isolados humanos de *Salmonella* com reduzida susceptibilidade a fluoroquinolonas, apesar da sua utilização em humanos ser muito anterior (WHO, 1998; Malorny *et al*, 1999; Aarestrup *et al*, 2000). De facto, no Reino Unido, após o licenciamento em 1993 e posterior uso disseminado de fluoroquinolonas em medicina veterinária, estirpes de *S. Typhimurium* DT104 apresentando o fenótipo ACSSuT e com resistência adicional à ciprofloxacina foram progressivamente isoladas de animais e de humanos (Threlfall *et al*, 1997). Na União Europeia, a Autoridade para a Segurança Alimentar alerta para a possível emergência de resistência às fluoroquinolonas, salientando a detecção em vários países de isolados humanos e animais de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* resistentes ao ácido nalidíxico (EFSA, 2006). Dados de um estudo europeu, realizado em 2000, mostram que apesar da resistência à ciprofloxacina ser rara (0,5%), a resistência ao ácido nalidíxico com diminuição de susceptibilidade à ciprofloxacina (CMI 0,25-1 µg/ml) foi detectada em 14% dos isolados de vários serótipos, incluindo *S. Enteritidis* (Threlfall *et al*, 2003). A resistência ao ácido nalidíxico tem sido considerada um bom indicador de possíveis insucessos terapêuticos das fluoroquinolonas (Hohmann, 2001), como sugerido por Aarestrup *et al* (2003) ao rever dados clínicos sobre a reduzida eficácia da terapêutica com quinolonas em doentes infectados com estirpes resistentes ao ácido nalidíxico. Estes autores propuseram a alteração do *breakpoint* da ciprofloxacina, de modo a serem consideradas estirpes com reduzida susceptibilidade todas as que apresentem CMIs maiores ou iguais a 0,125 µg/ml (Aarestrup *et al*, 2003).

Apesar da **resistência a cefalosporinas** de largo espectro em *Salmonella* não tifóide ser reconhecida desde os anos 80, e em países desenvolvidos ocorrer pouco frequentemente, estudos recentes indicam que a resistência a diferentes tipos de

antibióticos β -lactâmicos está a aumentar e apresenta-se mundialmente disseminada (Miriagou *et al*, 2004; Yates & Amyes, 2005; Arlet *et al*, 2006). Os resultados do estudo europeu, obtidos em 2000, mostram que a resistência a cefalosporinas de 3ª geração ainda é rara em *Salmonella*, com 0,6% dos isolados resistentes à cefotaxima (Threlfall *et al*, 2003), o que contrasta com os dados do NARMS nos EUA em que a resistência à ceftriaxona tem aumentado significativamente (Dunne *et al*, 2000). As origens dos isolados de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas são diversas, no entanto o uso de novos antibióticos β -lactâmicos em medicina veterinária poderá ter facilitado a disseminação dessas estirpes nos animais (Miriagou *et al*, 2004; Arlet *et al*, 2006). Por exemplo, nos EUA está bem documentada a disseminação de estirpes de *Salmonella* resistentes a ceftriaxona, nomeadamente dos serótipos Typhimurium e Newport, dos animais para os humanos, e a possível associação com o uso veterinário de uma cefalosporina de espectro alargado, o ceftiofur (Fey *et al*, 2000; Winokur *et al*, 2000; White *et al*, 2001; CDC, 2002).

Considerando-se que a resistência a múltiplos agentes antimicrobianos está a emergir em vários serótipos de *Salmonella* não tifóide, salienta-se a importância de programas de vigilância nacionais e internacionais como ferramentas fundamentais na monitorização da disseminação da resistência. Além disso, tornam-se essenciais medidas adicionais para minimizar a disseminação dos patogénicos em toda a cadeia alimentar, desde os locais de produção animal até ao consumidor (ex. melhoria das condições sanitárias e de higiene) e assegurar o uso prudente dos antibióticos nos animais.

1.3) Ocorrência de resistência em *Salmonella*: disseminação de clones e unidades de captura genética

A emergência da resistência a agentes antimicrobianos resulta frequentemente da exposição repetida a antibióticos e do acesso a reservatórios de genes de resistência disponíveis em ambientes polimicrobianos (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). O fluxo de elementos genéticos de transmissão horizontal promove o aumento do número de microrganismos resistentes e o aparecimento de clones epidémicos, ao enriquecer algumas estirpes em determinantes genéticos que lhes conferem melhores características de adaptação a nichos ecológicos particulares (Cantón *et al*, 2003; Witte, 2004). Desta forma, clones e elementos de captura genética, são dois elementos que, embora possam actuar individualmente, se associam frequentemente na manutenção e evolução de um dos problemas actualmente mais importantes em saúde pública: **a resistência a agentes antimicrobianos**.

1.3.1) Disseminação clonal

Um factor importante associado com o incremento de isolados de *Salmonella* apresentando resistência múltipla é a **disseminação nacional e internacional de determinados clones**. O comércio de animais vivos e, nomeadamente, os animais de reprodução, podem ser potenciais vias para disseminação, quer de clones, quer de genes de resistência, nos sistemas de produção. Com efeito, para além da difusão global de *S. Typhimurium* DT104, têm sido registados outros clones epidémicos com resistência a múltiplos agentes disseminados em determinadas regiões geográficas: *S. Typhimurium* produtora de OXA-30 e *S. enterica* [4,(5),12:i:-] em Espanha (Herrero *et al*, 2006); *S. Typhimurium* DT204 resistente às fluoroquinolonas e *S. Agona* com fenótipo ACSSuT e SGI1 na Bélgica em gado bovino e em aves, respectivamente; *S. Newport* MDR-AmpC, associada a gado bovino e seus produtos alimentares, nos EUA; *S. Paratyphi* B dT+ de origem avícola, na Alemanha, Bélgica e Holanda; *S. Paratyphi* B dT+ com fenótipo ACSSuT e SGI1 no Canadá (Butaye *et al*, 2006).

A resistência a múltiplos agentes antimicrobianos pode facilitar a selecção e a persistência de determinados clones em ambientes sujeitos a pressão selectiva por diferentes antibióticos, no entanto, o sucesso da disseminação clonal é também determinado por características da estirpe, tais como as que promovem a colonização e a virulência (Butaye *et al*, 2006). Recentemente, foram descritas alterações na virulência e

na permanência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, pelo favorecimento da formação de biofilmes e de outras características promotoras de colonização (ex. mobilidade), ocasionadas pela exposição a concentrações sub-inibitórias de antibióticos, condições a que os animais para consumo humano podem estar sujeitos em ambientes de produção intensiva (Linares *et al*, 2006). Características biológicas específicas de estirpes epidêmicas de *Salmonella* podem proporcionar mecanismos para o aumento da sua prevalência e disseminação geográfica, ao conferirem vantagens no crescimento e/ou sobrevivência em determinados ambientes (ex. tolerância ao calor, ao ácido, ao stress oxidativo e formação de biofilmes) ou virulência (Kang *et al*, 2007). Genericamente, a resistência a antibióticos em *Salmonella* poderá conduzir a um custo biológico de adaptação, mas que poderá ser compensado, facilitando a disseminação e persistência de determinados isolados na ausência de pressão selectiva (Zhang *et al*, 2006).

1.3.2) Disseminação associada a unidades de captura genética

A transferência horizontal de genes entre bactérias tem sido amplamente estudada ao longo dos anos, principalmente no que respeita aos mecanismos (conjugação, transformação e transdução) e elementos envolvidos nessa troca genética (Roy, 1999; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; Cantón *et al*, 2003). Nas últimas décadas, vários genes de resistência têm sido associados a elementos genéticos móveis, incluindo **plasmídeos** e **transposões**³ e, mais recentemente, a **integrões/cassetes de genes**⁴ mobilizáveis na sequência da sua inclusão nos anteriores (Roy, 1999; Schwarz &

³ Os **transposões** são elementos genéticos móveis, capazes de promover a sua própria transposição de um local genético para outro. Permitem a translocação de genes de resistência de um plasmídeo para outro, de um plasmídeo para o cromossoma bacteriano ou, ainda, do cromossoma para um plasmídeo, aumentando desta forma o potencial para a disseminação da resistência aos antibióticos (Miriagou *et al*, 2006). As **sequências de inserção** são pequenos elementos móveis, contendo o gene da transposase flanqueado pelas sequências invertidas, que podem mediar a transferência de genes de resistência formando **transposões compostos**, onde duas sequências de inserção que flanqueiam o gene cooperam na sua mobilização e na sua expressão (Miriagou *et al*, 2006).

⁴ Os **integrões de resistência** podem ser considerados sistemas específicos de integração e excisão para a captura, mobilização e expressão de cassetes de genes que codificam para a resistência a vários antibióticos e desinfetantes. Classicamente, os integrões caracterizam-se pela presença de um segmento conservado 5'CS, um segmento conservado 3'CS e cassetes de genes entre esses segmentos. O segmento conservado 5'CS inclui três elementos necessários à captura e expressão de cassetes de genes: o gene que codifica para a integrase (*intI*), um local de recombinação (*attI*), onde as cassetes são inseridas, e um ou mais promotores (Pant) responsáveis pela expressão das cassetes de genes integradas. O segmento conservado 3'CS geralmente contém o gene *qacEΔ1*, que confere resistência a compostos de amónio quaternário, e o gene *sulI*, que codifica resistência às sulfonamidas. As cassetes de genes contêm um elemento denominado "elemento de 59 pares de base" (59-be ou local *attC*) reconhecido pela integrase, que medeia os fenómenos de integração e excisão de cassetes (Fluit & Schmitz, 2004).

Chaslus-Dancla, 2001; McDermott *et al*, 2002; Cantón *et al*, 2003; Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006).

Os integrões foram os últimos elementos genéticos a ser identificados, tendo sido reconhecida a sua importância na aquisição e disseminação de genes de resistência a antibióticos. Estes elementos denominaram-se **integrões de resistência ou integrões móveis** (Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006). Actualmente, são reconhecidas 5 classes de integrões de resistência (definidas com base na sequência do gene *intI*), todas associadas a elementos móveis (sequências de inserção, transposões e plasmídeos conjugativos), que servem como veículos para a transferência genética (Mazel, 2006). Os integrões de classe 1 são os mais disseminados e envolvidos na transmissão da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, chegando mesmo a conter conjuntos complexos de cassetes de genes. Geralmente encontram-se associados a transposões derivados de Tn402 que podem estar incluídos em transposões maiores, tais como Tn21, localizados, quer no cromossoma, quer em plasmídeos conjugativos. Os integrões de classe 2 estão associados à família de transposões Tn7 e caracterizam-se por possuírem um gene *int* (*intI2*) com uma deleção, o que torna a integrase ineficaz, reduzindo assim a diversidade de cassetes de genes descritas. Em *Salmonella*, foram descritas estas duas classes de integrões sendo muitos deles detectados em plasmídeos diferentes (Fluit, 2005). Os integrões de classe 3 contêm um gene *int* (*intI3*) com propriedades semelhantes à integrase de classe 1, sendo também associados a transposões e plasmídeos ainda não completamente caracterizados. Os integrões das classes 4 e 5 foram identificados em espécies de *Vibrio*, sendo envolvidos na resistência ao trimetoprim. Mais recentemente, em contraste com o modelo clássico dos integrões de classe 1 (**Figura 2**), foram descritos integrões atípicos, denominados integrões do tipo *sull* complexos, pois contêm uma segunda cópia do segmento conservado 3'CS (**Figura 3**). Estes integrões de classe 1 complexos apresentam em comum, entre a duplicação dos segmentos 3'CS, a sequência de inserção *ISCR1* (anteriormente designada *orf513*), envolvida na aquisição e mobilização dos genes de resistência adicionais localizados a jusante.

Integrões, transposões e sequências de inserção têm sido frequentemente associados à rápida dispersão de genes de resistência que, ao juntarem-se física e funcionalmente em *clusters*, podem ser disseminados em bloco não só verticalmente, durante a divisão celular, mas também por transferência horizontal entre bactérias da mesma ou de diferentes espécies e géneros (Michael *et al*, 2006; Miriagou *et al*, 2006).

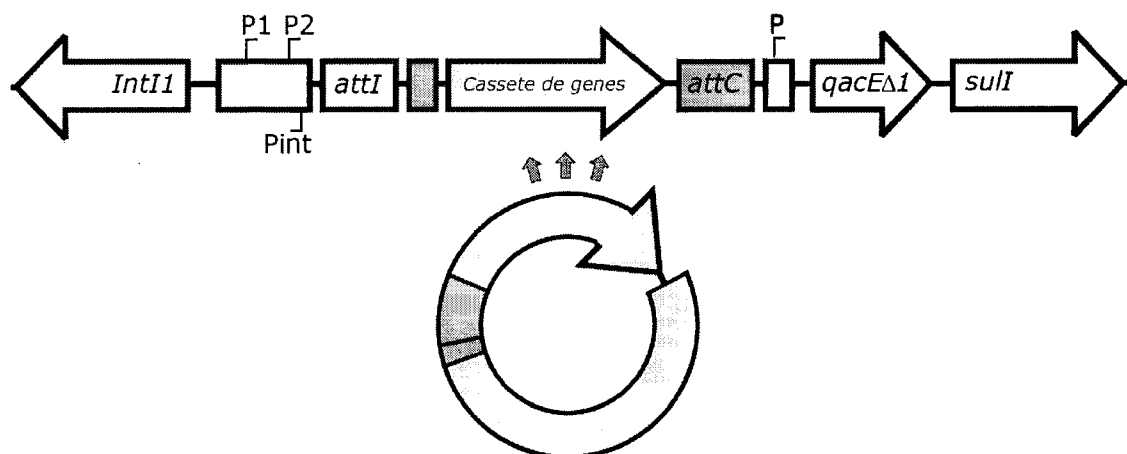


Figura 2: Representação esquemática de um integrão de classe 1 (adaptado de Fluit & Schmitz, 2004). P1, promotor para a transcrição das cassetes de genes; P2, segundo promotor que se encontra geralmente inactivo; p_{int} , promotor da integrase; *intI1*, gene que codifica para a integrase; *attI*, local de recombinação/integração; *qacEΔ1*, gene parcialmente suprimido que codifica para resistência a compostos de amónio quaternário; *sulI*, gene que codifica para resistência às sulfonamidas; P, promotor dos genes *qacEΔ1* e *sulI*; *attC*, sequência da cassette de genes reconhecida pela integrase.

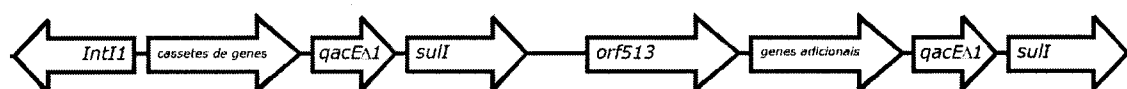


Figura 3: Representação esquemática de um integrão de classe 1 complexo, caracterizado pela duplicação do 3'CS e pela presença da *orf513*, renomeada *ISCR1* (adaptado de Fluit & Schmitz, 2004).

Estas configurações complexas de genes denominadas, **ilhas de resistência a antimicrobianos** (Miriagou *et al*, 2006), facilitam a selecção de bactérias com resistência múltipla apenas pela acção de um único antibiótico (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; McDermott *et al*, 2002; Cantón *et al*, 2003).

Para além dos *clusters* de genes de resistência, frequentemente localizados em plasmídeos, estes genes podem também estar presentes na região de resistência múltipla (região MDR) da SGI1, ***Salmonella Genomic Island 1***⁵ (**Figura 4**), inicialmente descrita no cromossoma das estirpes epidémicas de *S. Typhimurium* DT104 (Threlfall, 2000; Fluit, 2005; Velge *et al*, 2005; Mulvey *et al*, 2006). Esta região que confere simultaneamente resistência a cinco classes de agentes antimicrobianos, incluindo ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (fenótipo ACSSuT), localiza-se na proximidade da extremidade 3' da SGI1 e constitui um integrão complexo, denominado In104 (Mulvey *et al*, 2006). Variantes do *cluster* de genes de resistência a antibióticos da SGI1 foram descritos em diversos serótipos de *S. enterica*, sendo designados SGI1-A a SGI1-M (**Tabela 2**), existindo em todas as regiões MDR descritas um ou mais integroes (Cloeckaert *et al*, 2006; Mulvey *et al*, 2006; Levings *et al*, 2007; Vo *et al*, 2007). Estes *clusters* de genes resultam de eventos de recombinação cromossómicos ou de substituições de cassetes de genes num dos locais *attI1* (Mulvey *et al*, 2006). A região MDR da SGI1 parece apresentar uma estrutura particular, onde as alterações de genes por integração ou excisão são frequentes, criando novas variantes (isto é, diversos *clusters* de genes de resistência), tornando assim a SGI1 bem equipada para a adaptação bacteriana a novos antibióticos (Fluit, 2005).

Recentemente foi esclarecido o mecanismo de transferência da SGI1, por mobilização conjugativa, requerendo a presença de um plasmídeo auxiliador que proporciona as funções necessárias à conjugação, sendo considerada um **elemento integrativo mobilizável** (Mulvey *et al*, 2006). Esta dispersão de SGI1 em vários serótipos de *Salmonella* é preocupante, não só devido ao facto de estes passarem a apresentar as propriedades típicas de *S. Typhimurium* DT104, nomeadamente tendência

⁵ A SGI1 é uma ilha genómica de 43 Kb localizada no cromossoma de *S. Typhimurium* DT104 (Boyd *et al*, 2000, 2001). Os genes de resistência a antibióticos foram localizados num segmento de 13 Kb da SGI1, denominado **região MDR**. Esta ilha de resistência a antibióticos (região MDR) em *S. Typhimurium* DT104 contém todos os genes que conferem resistência às 5 classes de agentes antimicrobianos associados ao fenótipo de resistência ACSSuT (Briggs & Fratamico, 1999). Assim, os dois integroes previamente identificados por Sandvang *et al* (1998), InC contendo o gene *aadA2* e o gene *sulI* parcialmente suprimido e InD contendo o gene *bla_{PSE-1}* e o gene *sulI* intacto, foram localizados nas extremidades 5' e 3' desse fragmento, respectivamente, encontrando-se entre eles os genes *floR* e *tet(G)* e duas *open reading frames*, *orf1* e *orf2* (Briggs & Fratamico, 1999).



Figura 4: Organização do *cluster* de genes da região de resistência múltipla da SGI1 de *S. Typhimurium* DT104 (adaptado de Cloeckeaert & Schwarz, 2001).

Tabela 2: Epidemiologia das variantes de SGI1

Variante SGI1	Serótipos	Fenótipo	Genes adicionados ou (suprimidos)
SGI1	DT104, Agona, Paratyphi B dT+	ACSSuT	-
A	Agona, Kiambu	ACSSuTTm	<i>orf513-dfrA10-sul1</i>
B	DT104, Paratyphi B dT+	ASu	(<i>aadA2</i> , <i>floR</i> , <i>tet</i> (G))
C	DT104, Agona, Paratyphi B dT+	SSu	(<i>floR</i> , <i>tet</i> (G), <i>bla</i> _{PSE-1})
D	Agona, Infantis	(A)SSuTm	SGI1-C + <i>orf513-dfrA10-sul1</i>
E	DT104	ASSuT	<i>floR5'Δ3'</i> , IS6100
F	Albany, Cerro, Dusseldorf	ACSuTTm	<i>dfrA1-orfC</i> (<i>aadA2</i>)
G	Agona	ASSuTm	SGI1-B + <i>orf513-dfrA10-sul1</i>
H	Newport	ACSSuTGm	<i>aac</i> (3)-Id, <i>aadA7</i> (<i>aadA2</i>)
I	Derby	CSSuTTm	<i>dfrA1-orfC</i> (<i>bla</i> _{PSE-1})
J	Emek	CSuTTm	SGI1-F (<i>bla</i> _{PSE-1} , <i>qacEAI</i>)
K	Kentucky	(A)SSu(T)Gm	SGI1-H (<i>floR</i> , <i>tet</i> (G), <i>bla</i> _{PSE-1})
L	Newport	AC(S)SuTTm(Gm)	<i>dfrA15</i> (<i>aadA2</i>)
M	DT104	AC(S)SuTGmKTo	<i>aadB</i> (<i>aadA2</i>)

Tm, trimetoprim; Gm, gentamicina; K, canamicina; To, tobramicina; *aac*(3)-Id = *aacC5*.

para maior virulência e maior capacidade de disseminação, mas também porque a sua localização cromossômica lhe dá estabilidade, mesmo na ausência de pressão selectiva (Mulvey *et al*, 2006). Para além disso, a transferência horizontal da SGI1 poderá contribuir para a disseminação de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, não só entre diferentes serótipos de *Salmonella*, mas também entre outros géneros com importância clínica (Mulvey *et al*, 2006).

Em *Salmonella*, muitos dos genes conhecidos que conferem resistência aos antibióticos estão localizados em **plasmídeos**, constituindo o principal mecanismo da resistência adquirida (Carattoli, 2003; Michael *et al*, 2006). Também a reunião em plasmídeos de genes e/ou outros elementos genéticos que integram determinantes de virulência e de resistência a antibióticos é uma tendência preocupante, verificada em *Salmonella enterica* (Fluit, 2005; Miriagou *et al*, 2006). Veja-se o exemplo do plasmídeo de virulência do tipo IncFII caracterizado por Villa & Carattoli (2005) em *S. Typhimurium* isolada em Itália. Este plasmídeo é constituído por dois integrões (In-t7: *aadB*, *orf513-dfrA23* e In-t8: *bla*_{OXA-30}-*aadA1*) e por dois transposões (Tn21-like e Tn1696-like), formando assim uma região complexa de genes de resistência (ilha de resistência), para além dos genes de virulência *spvC*, *rck* e *pefA*, responsáveis por um aumento do crescimento bacteriano durante a fase sistémica da doença, em ratos, pela resistência à destruição pelo complemento e biossíntese de fímbrias envolvidas na aderência ao epitélio intestinal, respectivamente.

O facto de determinados plasmídeos poderem ser identificados em várias bactérias patogénicas, oriundas de diferentes países, demonstra o papel importante destas estruturas na disseminação da resistência a antibióticos (Carattoli, 2003). Assim, vários plasmídeos similares contendo genes de resistência a cefalosporinas de largo espectro têm sido descritos em isolados de *Salmonella*, bem como, alguns deles, em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*: *bla*_{TEM-27} (Espanha), *bla*_{SHV-12} (Itália), *bla*_{CTX-M} (Rússia, Hungria e Grécia), *bla*_{SHV-5} (Albânia e EUA), *bla*_{CTX-M3} (Taiwan) (Carattoli, 2003). Com efeito, o rumen dos animais tem sido considerado um dos locais onde ocorre a transferência genética entre microrganismos, tendo sido recentemente verificada a transferência de um plasmídeo contendo o gene *bla*_{CMY-2} de *Klebsiella* para *Salmonella*, em protozoários localizados no rumen de diferentes espécies animais (McCuddin *et al*, 2006) Esta observação salienta a necessidade de abordagens conjuntas no sentido de reduzir a disseminação de estirpes bacterianas resistentes.

1.3.3) Resistência aos diferentes grupos de antimicrobianos

Actualmente, os genes de resistência detectados em *Salmonella*, não só afectam a actividade dos primeiros antibióticos a serem introduzidos no mercado (alguns ainda usados), mas também codificam para resistência às novas moléculas, frequentemente usadas em terapêutica humana (Fluit, 2005). Seguidamente apresentam-se os genes e mutações, mais frequentes em *Salmonella*, associados a resistência a diferentes grupos de antibióticos, salientando-se a presença desses genes de resistência em elementos genéticos (integrões, transposões, sequências de inserção e plasmídeos) de particular importância na emergência e disseminação da resistência.

Resistência aos β -lactâmicos. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Salmonella* é mediada principalmente por enzimas do tipo β -lactamase, descritas em isolados de diversos serótipos e origens geográficas (Miriagou *et al*, 2004; Arlet *et al*, 2006; Michael *et al*, 2006). Alguns dos genes detectados codificam para β -lactamases com um espectro de actividade reduzido (ex. TEM-1, PSE-1), enquanto outras apresentam actividade hidrolítica sobre β -lactâmicos de largo espectro, como as cefalosporinas de 3ª geração, incluindo-se no grupo das ESBLs⁶ (como exemplo, as tipo- TEM, SHV, CTX-M, PER) ou no grupo das AmpC⁷ (como exemplo, as tipo-CMY, DHA, ACC-1). Mais recentemente, uma carbapenemase plasmídica do tipo KPC (KPC-2), com actividade sobre todos os β -lactâmicos foi detectada em *Salmonella* (Tabela 3). Diferentes elementos genéticos estão envolvidos na mobilização e na expressão de alguns destes genes, nomeadamente sequências de inserção (IS) e integrões. Por exemplo, várias β -lactamases do tipo CTX-M foram descritas em diferentes serótipos de *Salmonella*, muitas delas localizadas em plasmídeos e associadas a sequências de inserção do tipo *ISEcp1*, responsáveis pela mobilização e expressão dos genes *bla*_{CTX-M} (Miriagou *et al*, 2006). No entanto, a associação mais comum entre elementos do tipo IS e genes que codificam para β -lactamases inclui os plasmídeos contendo *bla*_{CMY-2} que têm emergido em vários serótipos de *Salmonella* nos últimos anos, em várias áreas geográficas, resultado da mobilização por essas IS (ex. *ISEcp1*) e

⁶ As ESBL (β -lactamases de largo espectro) incluem as β -lactamases da classe A do sistema de classificação de Ambler, com capacidade hidrolítica sobre as oximino-cefalosporinas (ex. cefotaxima, ceftazidima), mas não sobre as cefamicinas, e inibidas pelo ácido clavulânico e outros inibidores similares (Parry, 2003; Miriagou *et al*, 2004).

⁷ As β -lactamases do tipo AmpC pertencem à classe C do sistema de classificação de Ambler, são cefalosporinas com capacidade hidrolítica sobre as cefamicinas (ex. cefoxitina) e não são inibidas pelo ácido clavulânico (Parry, 2003; Miriagou *et al*, 2004).

Tabela 3: Epidemiologia das β -lactamases que conferem resistência a cefalosporinas de largo espectro em *Salmonella* (adaptado de Arlet *et al*, 2006)

Designação	Serótipo	Origem
TEM		
TEM-3	Kedougou, Panama, Typhimurium	França, Marrocos, Martinica
TEM-4	Mbandaka	França, Tunísia
TEM-52 *	Agona, Blockley, Enteritidis, Hadar, London, Panama, Saint-Paul, Stanley, Thompson, Typhimurium	França, Holanda, Reino Unido, Grécia, Hungria, Coreia
TEM-63	Isangi, Muenchen	Holanda, África do Sul
Outras	Isangi, Mbandaka, Othmarschen,	Holanda, Espanha, Algéria, África do Sul
SHV		
SHV-2	Virchow, Wien	Holanda, Canadá, Algéria, Líbia, Tunísia
SHV-2a	Enteritidis, Mbandaka, Typhimurium, Wien	Polónia, Tunísia, Taiwan
SHV-5	Brandenburg, Enteritidis, Infantis, Isangi, Senftenberg, Typhimurium	Áustria, Grécia, Roménia, Honduras, África do Sul, Índia
SHV-12	Babelsberg, Concord, Enteritidis, Newport, Typhimurium	Itália, Holanda, Reino Unido, Mali, Senegal, África do Sul, Tanzânia, Taiwan
CTX-M		
CTX-M-1 (3,15,28,32*)	Albany, Anatum, Cholerasuis, Enteritidis, Infantis, Isangi, Kentuchi, Mbandaka, Mons, Oranienburg, Saint-Paul, Senftenberg, Typhimurium, Virchow, Wien	França, Grécia, Holanda, Polónia, Reino Unido, Honduras, Algéria, Senegal, Tunísia, Libano, Paquistão, Taiwan
CTX-M-2 (2,4,5,6,7)	Agona, Enteritidis, Infantis, Oranienburg, Typhimurium	Bielo-Rússia, Grécia, Letónia, Holanda, Rússia, Argentina
CTX-M-9 (9*,14,17,27)	Enteritidis, Livingstone, London, Panama, Stanley, Virchow	França, Espanha, Reino Unido, Tunísia, Hong-Kong, Japão, Coreia, Taiwan, Tailândia
PER		
PER-1	Typhimurium	Turquia
PER-2	Agona, Typhimurium	Argentina
CMY		
CMY-2*	Agona, Ajiobo, Albany, Anatum, Bredeney, Cairo, Chester, Cholerasuis, Cremieu, Derby, Duesseldorf, Enteritidis, Give, Gloucester, Heidelberg, Infantis, Kaduna, Kimuenza, Mikawasima, Mons, Newport, Redba, Saint-Paul, Schleissheim, Schwarzengrund, Senftenberg, Stanley, Thompson, Typhimurium, Wagenia, Worthington	França, Grécia, Itália, Roménia, Espanha, Reino Unido, Canadá, Honduras, México, EUA, Algéria, Gambia, África do Sul, Iraque, Taiwan
Outras	Senftenberg, Typhimurium, Wien	Reino Unido, Tunísia
DHA-1	Enteritidis, Montevideo, Senftenberg	Reino Unido, Coreia, Arábia Saudita
ACC-1	Bareilly, Braenderup, Infantis, Livingstone, Mbandaka,	Holanda, Tunísia
KPC-2	Cubana	EUA

* Isolados obtidos de várias fontes: humanos, animais e alimentos

posterior transferência para diferentes plasmídeos (Arlet *et al*, 2006; Miriagou *et al*, 2006). Outro elemento com as mesmas funções inclui a *ISCR1* (*orf513*), inserida em integrons de classe 1 complexos, associada aos genes *bla*_{CTX-M-2}, localizados em plasmídeos conferindo resistência múltipla em *Salmonella* na Argentina (Di Conza *et al*, 2002; Orman *et al*, 2002). Adicionalmente, alguns dos genes que codificam para β -lactamases encontram-se inseridos como cassetes em integrons de classe 1 (ex. *bla*_{OXA-1}) podendo mesmo fazer parte do *cluster* de genes na SGI1 (ex. *bla*_{PSE-1}). O integrão de classe 1 contendo o gene *bla*_{PSE-1} (também denominado *bla**P1b* ou *bla*_{CARB-2}), tem sido descrito fundamentalmente no clone de *S. Typhimurium* DT104 disseminado mundialmente (Sandvang *et al*, 1998; Ridley & Threlfall, 1998; Baggesen *et al*, 2000; Guerra *et al*, 2000; Ebner *et al*, 2004; Randall *et al*, 2004; Nógrády *et al*, 2005; Miko *et al*, 2005), bem como em outros serótipos de *Salmonella* contendo as variantes da SGI1 (Boyd *et al*, 2002; Mulvey *et al*, 2006). Também o gene *bla*_{OXA-1} / *bla*_{OXA-30} tem sido associado a um tipo de integrão de classe 1 em isolados de *Salmonella* de vários países Europeus (Tosini *et al*, 1998; Guerra *et al*, 2000; Hanson *et al*, 2002; Lindstedt *et al*, 2003). Plasmídeos conjugativos do tipo IncFI contendo o integrão *bla*_{OXA-1}-*aadA1*, juntamente com o integrão *aadB-catB3*, foram responsáveis pela aquisição e disseminação da resistência a múltiplos antibióticos em *Salmonella* da Albânia (Tosini *et al*, 1998). Mais recentemente, esta estrutura tem sido localizada em plasmídeos do tipo IncFII contendo genes de virulência, para além de genes de resistência em isolados de *Salmonella* de Espanha (Guerra *et al*, 2002; Herrero *et al*, 2006) e de Itália (Villa & Carattoli, 2005). A disseminação de um plasmídeo específico (do tipo IncII e conjugativo) associado à disseminação de uma ESBL foi também recentemente demonstrado para a *bla*_{TEM-52}, em isolados de *Salmonella* de vários serótipos, de diferentes origens (aves e humanos) e países (Bélgica e França) (Cloeckaert *et al*, 2007).

Resistência às quinolonas/fluoroquinolonas. Em *Salmonella*, o principal mecanismo de resistência às quinolonas decorre de mutações cromossómicas diversas nos genes que codificam para a DNA girase (topoisomerase II), *gyrA* e *gyrB*, e para a topoisomerase IV, *parC* e *parE*, enzimas alvo das quinolonas (Hopkins *et al*, 2005; Giraud *et al*, 2006; Michael *et al*, 2006). Inicialmente a resistência às quinolonas nesta bactéria foi atribuída a mutações pontuais no gene *gyrA*, sendo progressivamente detectadas estirpes com mutações duplas nesse gene e adicionalmente com mutações nos genes *gyrB*, *parC* e *parE*, apresentando altos níveis de resistência a

fluoroquinolonas (Hopkins *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005; Giraud *et al*, 2006). Geralmente, são necessárias múltiplas mutações para se atingir resistência clínica em *Enterobacteriaceae* (Robicsek *et al*, 2006). Em *S. Enteritidis*, o principal serótipo associado com resistência ao ácido nalidixico, as mutações no gene *gyrA*, nomeadamente as que determinaram substituições nos aminoácidos das posições 83 e/ou 87 na região QRDR⁸, são as mais descritas (Soto *et al*, 2003; Miko *et al*, 2005). Adicionalmente às múltiplas mutações nos genes descritos, um sistema de efluxo para múltiplos antibióticos denominado AcrAB-TolC (bomba de efluxo constituída pela proteína de efluxo AcrB na membrana citoplasmática, pela proteína acessória periplasmática AcrA que liga a AcrB à proteína da membrana externa TolC) foi também considerado responsável pelos altos níveis de resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella* (Hopkins *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005; Giraud *et al*, 2006), nomeadamente em *S. Typhimurium* DT104, onde actua sinergicamente com as bombas FLOR e TET(G), responsáveis pelo efluxo de cloranfenicol/florfenicol e tetraciclina, respectivamente (Baucheron *et al*, 2004). Mais recentemente, um mecanismo de resistência transferível foi detectado em bactérias de Gram negativo, sendo o primeiro gene denominado *qnr* (*quinolone resistance*) (Nordmann & Poirel, 2005; Robicsek *et al*, 2006). As várias proteínas da família Qnr (protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição pelas quinolonas) são responsáveis pela resistência ao ácido nalidixico e diminuição de susceptibilidade às fluoroquinolonas, de acordo com os *breakpoints* do CLSI (Nordmann & Poirel, 2005). No entanto, a importância clínica dos genes *qnr* poderá ser ampliada pelo facto de facilitarem a selecção de estirpes com mutações cromossómicas que conferem níveis mais elevados de resistência às quinolonas e também pelo efeito aditivo com outros mecanismos de resistência que poderão estar presentes na célula bacteriana (Hopkins *et al*, 2005; Robicsek *et al*, 2006). Vários genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) e suas variantes (*qnrA1* a *qnrA6*; *qnrS1* a *qnrS2* e *qnrB1* a *qnrB5*), disseminados mundialmente, foram detectados em plasmídeos conjugativos em *Enterobacteriaceae*, incluindo em vários serótipos de *Salmonella* (Tabela 4) (Nordmann & Poirel, 2005; Gay *et al*, 2006; Robicsek *et al*, 2006). Os genes *qnrA* e

⁸ A região **QRDR** (*quinolone resistance-determining region*) é uma região específica dos genes que codificam para as enzimas alvo das quinolonas, onde as mutações podem conduzir à diminuição da ligação às quinolonas. A região QRDR do gene *gyrA* está localizada numa região do produto codificado pelo gene localizada entre os aminoácidos 67 e 106, onde habitualmente ocorrem mutações associadas com resistência às quinolonas em *S. enterica* (Hopkins *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005; Giraud *et al*, 2006). Também se encontram definidas as regiões QRDR onde ocorrem mutações nos genes *gyrB* e *parC* (Hopkins *et al*, 2005; Velge *et al*, 2005).

qnrB estão geralmente localizados em estruturas complexas tipo integração contendo a *ISCR1*, enquanto o gene *qnrS* não foi detectado em integrações, mas associado a estruturas tipo IS (Robicsek *et al*, 2006). A resistência às quinolonas mediada por plasmídeos continua a não ser frequente entre *Salmonella* não tifóide, mas a presença dos genes *qnr*, num isolado de origem avícola, poderá promover a rápida disseminação da resistência às quinolonas e a sua possível disseminação dos animais ao Homem, através da cadeia alimentar. Recentemente, uma nova variante do gene *qnrA* (*qnrA3*) foi identificada em isolados clínicos de *S. Enteritidis* em Hong Kong, sendo localizada em diferentes plasmídeos conjugativos que continham também o gene *bla*_{CTX-M-14}, representando um problema adicional ao conferir resistência a esses dois grupos de agentes antimicrobianos (Cheung *et al*, 2005). Mais recentemente foi detectado um novo mecanismo de resistência, veiculado por plasmídeos, associado a uma nova variante do gene que codifica para a acetiltransferase AAC(6')-Ib [*aac*(6')-Ib-cr] e responsável pela diminuição de susceptibilidade à ciprofloxacina. Esta enzima é capaz de inativar dois grupos diferentes de agentes antimicrobianos, os aminoglicosídeos (canamicina, amicacina e tobramicina) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) (Robicsek *et al*, 2006), o que acrescido ao facto de este gene se localizar frequentemente em plasmídeos contendo ESBL, permite que o uso de quinolonas selecione isolados com resistência a diferentes grupos de antimicrobianos de grande importância clínica (Robicsek *et al*, 2006). Embora esta enzima seja encontrada em plasmídeos conjugativos ainda não foi descrita a sua presença em *Salmonella*.

Tabela 4: Epidemiologia dos genes *qnr* em *Salmonella*

Gene	Organismo	Origem	Ano	Referência
<i>qnrA1</i>	<i>S. Concord</i>	Etiópia	2005	Cattoir <i>et al</i> , 2007
<i>qnrA3</i>	<i>S. Enteritidis</i>	Hong Kong, China	2003	Cheung <i>et al</i> , 2005
<i>qnrB2</i>	<i>S. Keurmassar</i>	Senegal	2000	Garnier <i>et al</i> , 2006
	<i>S. Mbandaka</i>	EUA	2002	Gay <i>et al</i> , 2006
<i>qnrB5</i>	<i>S. Berta</i>	EUA	1997-2000	Gay <i>et al</i> , 2006
<i>qnrS1</i>	<i>S. Bovismorbificans</i>	EUA	2002	Gay <i>et al</i> , 2006
	<i>S. Infantis</i>	Alemanha	2004	Kehrenberg <i>et al</i> , 2006
<i>qnrS2</i>	<i>S. Anatum</i>	EUA	2003	Gay <i>et al</i> , 2006

Resistência às tetraciclinas. Os genes *tet* detectados em *Salmonella* codificam para uma proteína capaz de expulsar as tetraciclinas (bombas de efluxo) (Michael *et al*, 2006). Os genes *tet(A)* e *tet(B)* são os mais frequentemente detectados entre vários serótipos de *Salmonella* e encontram-se normalmente associados aos transposões Tn1721 e Tn10, respectivamente, que por sua vez estão inseridos em plasmídeos que conferem resistência múltipla (Michael *et al*, 2006). Veja-se o exemplo do gene *tet(A)*, localizado no transposição Tn1721 e em alguns casos associado a plasmídeos conjugativos, que se encontra largamente difundido em estirpes de *Salmonella* de animais em Itália (Pezzella *et al*, 2004). Estudos recentes, identificaram a ligação de parte do Tn1721 com o Tn3, um transposição contendo o gene *bla*_{TEM-1}, e sugerem a disseminação destes elementos como uma unidade, promovendo assim a disseminação simultânea da resistência a duas classes de antibióticos, penicilinas e tetraciclinas (Pasquali *et al*, 2005). Outros genes *tet*, nomeadamente *tet(C)* e *tet(D)* associados, em alguns casos, a plasmídeos, foram também identificados em vários serótipos de *Salmonella* (Michael *et al*, 2006). Em contraste, o gene *tet(G)* parece estar restrito a isolados de *Salmonella* contendo a SGI1, nomeadamente ao clone de *S. Typhimurium* DT104, fazendo parte do *cluster* de genes de resistência múltipla identificado por Briggs & Fratamico (1999).

Resistência aos fenicóis. Em *Salmonella*, os mecanismos de resistência caracterizados incluem inactivação enzimática por acetiltransferases codificadas por genes do tipo A (*catA*) ou B (*catB*), para além de proteínas de efluxo específicas para cloranfenicol (gene *cmlA*) ou para cloranfenicol/florfenicol (gene *floR*) (Michael *et al*, 2006). Os genes *catA* (*catA1* e *catA2*) foram detectados em vários tipos de plasmídeos, enquanto os genes *catB* (*catB2*, *catB3* e *catB8*) foram localizados em cassetes de genes inseridas em integrões de classe 1 com resistência múltipla, ambos disseminados por vários serótipos de *Salmonella* (Michael *et al*, 2006). Os genes *cmlA* descritos em *Salmonella* também fazem parte de integrões de classe 1 localizados em plasmídeos de vários serótipos (Michael *et al*, 2006). Em contraste, o gene *floR* encontra-se principalmente como um dos componentes do *cluster* de genes da SGI1 (Arcangioli *et al*, 1999). Mais recentemente, foi identificado em plasmídeos, em diferentes serótipos de *Salmonella*, nomeadamente em plasmídeos contendo também o gene *bla*_{CMY-2} e em que o gene *floR* se encontrava flanqueado por regiões tipo transposase (Doublet *et al*, 2004). Assim, a

pressão selectiva por antibióticos do grupo dos fenicóis poderá contribuir para a disseminação dos plasmídeos contendo o gene *bla*_{CMY-2}.

Resistência aos aminoglicosídeos. O mecanismo mais frequentemente associado a resistência aos aminoglicosídeos em *Salmonella* é a produção de enzimas modificadoras (adicionam determinados grupos químicos à molécula de antibiótico levando à perda da sua actividade antimicrobiana) pertencentes a três classes: adeniltransferases ou nucleotidiltransferases (genes *aad* ou *ant*), acetiltransferases (genes *aac*) e fosfotransferases (genes *aph*) (Michael *et al*, 2006).

Relativamente aos genes que codificam as adeniltransferases foram descritos em *Salmonella* os genes *aadA* [*ant*(3'')], que conferem resistência à estreptomicina e/ou espectinomicina e os genes *aadB* [*ant*(2'')], que conferem resistência à gentamicina, canamicina e tobramicina (Michael *et al*, 2006). Os genes *aadA* encontram-se largamente disseminados entre os vários serótipos de *Salmonella* e localizam-se fundamentalmente em integrões de classe 1 e de classe 2. Assim, cassetes de genes do tipo *aadA* (isoladamente ou associadas a outros genes) têm sido registadas em todo o mundo, em isolados clínicos (Guerra *et al*, 2000; Lindstedt *et al*, 2003; Randall *et al*, 2004), de produtos alimentares (Guerra *et al*, 2000; White *et al*, 2001; Ahmed *et al*, 2005; Nógrády *et al*, 2005; Miko *et al*, 2005) e de animais produtores de alimentos (Baggesen *et al*, 2000; Ebner *et al*, 2004; Gebreyes *et al*, 2004; Randall *et al*, 2004). Muitos dos integrões de classe 1 encontram-se geralmente associados com vários tipos de transposões, nomeadamente o Tn21 que contém o integrão In2, em que a resistência à estreptomicina é codificada pelo gene *aadA1*, um dos genes mais disseminados em bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (Miriagou *et al*, 2006). Também os integrões de classe 2 descritos em *Salmonella*, contendo as cassetes *dfrA1-sat1-aadA1*, têm sido localizados no transposição Tn7 (Miriagou *et al*, 2006). Os integrões contendo genes *aadA* encontram-se inseridos em plasmídeos ou estão incluídos no *cluster* de genes da SGI1, como o integrão de classe 1 contendo o gene *aadA2*. Os genes *aadB* também têm sido descritos em cassetes de genes juntamente com outros genes de resistência (Tosini *et al*, 1998; Lindstedt *et al*, 2003; Randall *et al*, 2004) e mais recentemente numa variante da SGI1 (Vo *et al*, 2007).

Vários tipos de genes que codificam para acetiltransferases, nomeadamente *aacC* [*aac*(3)] e *aacA* [*aac*(6')], estão descritos em diversos serótipos de *Salmonella*, localizados, quer em plasmídeos (Tosini *et al*, 1998), quer no cromossoma, incluindo

em variantes da SGI1 (Michael *et al*, 2006; Mulvey *et al*, 2006). Em isolados de *Salmonella* resistentes à gentamicina e à apramicina, este último de uso exclusivo nos animais, tem sido descrito o gene *aac(3)-IV* que codifica para uma 3-N-acetiltransferase IV (Michael *et al*, 2006).

Em *Salmonella* foram identificados vários tipos de genes que codificam para fosfotransferases, normalmente localizados em elementos genéticos móveis e associados a outros genes de resistência. Em isolados de *Salmonella* resistentes à canamicina têm sido descritos os genes *aphA1* [*aph(3')-Ia*] e *aphA2* [*aph(3')-IIa*] (Guerra *et al*, 2004a; Miko *et al*, 2005). Os dois genes denominados *strA* [*aph(3'')-Ib*] e *strB* [*aph(6)-Id*], que conferem resistência apenas à estreptomicina, são encontrados frequentemente ligados e associados ao gene que confere resistência às sulfonamidas, *sul2* (Michael *et al*, 2006). Por exemplo, recentemente, a sequência *sul2-strA-strB* foi identificada numa região de resistência múltipla localizada no cromossoma de *S. Typhimurium* DT193 e num plasmídeo do tipo IncI de *S. Enteritidis*, com uma organização genética semelhante (Daly *et al*, 2005). Adicionalmente, os genes *strA-strB* têm sido descritos associados a um tipo de transposição, Tn5393, incluindo a um derivado de Tn5393, caracterizado pela presença de elementos do tipo IS, típicos de um patogénico de plantas (Pezzella *et al*, 2004).

Resistência ao trimetoprim. A resistência ao trimetoprim em *Enterobacteriaceae* ocorre fundamentalmente devido à produção de dihidrofolato redutases não inibidas pelo trimetoprim (Sköld, 2001; Michael *et al*, 2006). Em *Salmonella*, foram descritos vários tipos de genes que codificam para as dihidrofolato redutases (genes *dfr*) do tipo *dfrA*, sendo a maioria cassetes de genes localizados em integrões de classe 1 e de classe 2. O gene *dfrA1* tem sido considerado o mais disseminado entre os vários serótipos de *Salmonella*, quer em integrões de classe 1, quer de classe 2 (Guerra *et al*, 2000; Lindstedt *et al*, 2003; Ahmed *et al*, 2005; Miko *et al*, 2005; Peirano *et al*, 2006), para além de mais recentemente ter sido identificado em variantes da SGI1, tal como o gene *dfrA10* (Michael *et al*, 2006; Mulvey *et al*, 2006). Várias cassetes de genes do tipo *dfrA* têm sido localizadas em plasmídeos (Sköld, 2001; Lindstedt *et al*, 2003; Miko *et al*, 2005), incluindo o gene *dfrA12* associado a plasmídeos com resistência múltipla de elevado peso molecular contendo integrões e genes de virulência (Guerra *et al*, 2001).

Resistência às sulfonamidas. A resistência às sulfonamidas em bacilos de Gram negativo, incluindo em *Salmonella*, deve-se à aquisição de um dos três genes, *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam para formas de dihidropteroato sintetase não inibidas por estes agentes antimicrobianos (Sköld, 2000; Michael *et al*, 2006). A associação destes genes a unidades de captura genética com capacidade de transferência horizontal é fundamental para facilitar a sua disseminação entre os vários serótipos de *Salmonella*. O gene *sul1* é normalmente detectado no segmento conservado 3'CS dos integrões de classe 1, quer localizados em plasmídeos, quer na SGI1. Em contraste, o gene *sul2* encontra-se normalmente associado a outros tipos de elementos móveis, tais como plasmídeos pequenos e não conjugativos, ou de elevado peso molecular e transmissíveis (Skold, 2000; Enne *et al*, 2001), que até podem conferir uma vantagem para o seu hospedeiro (Enne *et al*, 2004). O gene *sul3* é o gene que confere resistência às sulfonamidas mais recentemente descrito (Perreten & Boerlin, 2003), tendo sido detectado em vários isolados humanos, animais e alimentares de *E.coli* (Grape *et al*, 2003; Guerra *et al*, 2003; Perreten & Boerlin, 2003; Bischoff *et al*, 2005; Hammerum *et al*, 2006) e em vários serótipos de *Salmonella* (Guerra *et al*, 2004b). Vários estudos observaram a localização deste gene em plasmídeos diferentes (Grape *et al*, 2003; Perreten *et al*, 2003; Guerra *et al*, 2004b), nomeadamente num plasmídeo conjugativo contendo o gene *sul3* flanqueado por estruturas tipo transposição (IS15 Δ /26) (Perreten & Boerlin, 2003). Um estudo mais recente descreve a ligação do gene *sul3* a várias cassetes de genes (*sat*, *psp*, *aadA2*, *cmlA* e *aadA1*) de um integrão disseminado por plasmídeos conjugativos em estirpes de *E.coli* de suínos dos EUA (Bischoff *et al*, 2005).

Em *Salmonella*, os genes de resistência a antibióticos podem ser disseminados por integrões, transposões e ilhas genómicas móveis, podendo residir no cromossoma ou em plasmídeos. Consequentemente, o uso de um determinado antimicrobiano pode conduzir à selecção de bactérias resistentes a esse agente, mas também a todos os agentes antimicrobianos cujos genes de resistência estejam geneticamente ligados, isto é, formando um *cluster* de genes no mesmo elemento móvel (co-selecção de fenótipos de resistência a múltiplos agentes) (Velge *et al*, 2005). Adicionalmente, a co-selecção de marcadores de resistência e de virulência no mesmo elemento genético conduz à emergência de estirpes que poderão dificultar ou mesmo comprometer o tratamento clínico da salmonelose (Miriagou *et al*, 2006).

A caracterização dos isolados apresentando resistência múltipla, quer pela identificação de clones epidêmicos, quer pela identificação de unidades de captura genética que poderão contribuir para a manutenção e disseminação dos determinantes da resistência, torna-se fundamental para o estabelecimento de relações epidemiológicas entre os animais produtores de alimentos e os humanos hospitalizados, de forma a determinar a origem e fluxo da disseminação da resistência.

1.4) Objectivos

Salmonella não tifóide é considerado um dos agentes zoonóticos mais importante a nível mundial, frequentemente implicado em doenças de origem alimentar. A emergência e disseminação de isolados de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos associados com infecções humanas transmitidas ao Homem pela cadeia alimentar tem vindo a constituir um desafio premente em saúde pública. Um modo eficiente de aquisição e disseminação dos determinantes de resistência consiste na sua associação a unidades de captura genética móveis e na sua manutenção em clones bem adaptados a diferentes nichos ecológicos, com possíveis repercussões terapêuticas em medicina humana.

Considerando os problemas crescentes associados ao género *Salmonella* verificados a nível mundial, tornou-se importante realizar um estudo que avaliasse a prevalência, a origem e sentido de disseminação da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em *Salmonella*. Deste modo, o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento da epidemiologia da resistência a vários agentes antimicrobianos em isolados de *Salmonella* de diversas origens, nomeadamente, humana, alimentar e ambiental, obtidos em Portugal. Assim, constituíram objectivos do presente trabalho:

- Avaliar o perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos de diferentes famílias (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, quinolonas e nitrofurantoína).
- Caracterizar os determinantes genéticos da resistência a vários grupos de agentes antimicrobianos.
- Identificar os genes associados a unidades de captura genética e avaliar a sua mobilização horizontal por conjugação, de modo a determinar a sua participação na expressão e disseminação da resistência a antibióticos.
- Avaliar a importância da disseminação clonal na prevalência de *Salmonella* resistentes e na acumulação de resistências a múltiplos antibióticos.
- Avaliar a contribuição dos diferentes nichos ecológicos como origem e reservatório de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos.
- Integrar os dados obtidos de forma a elucidar a emergência, disseminação e manutenção de *Salmonella* resistentes a antibióticos.
- Contribuir para a implementação de um sistema nacional de vigilância da resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella*.

1.5) Lista de trabalhos que integram a tese

Os resultados obtidos no decurso do presente trabalho foram previamente publicados, ou submetidos para publicação, em jornais científicos de índole internacional. Os resultados e discussão são assim apresentados, no capítulo 2, sob a forma de artigos científicos, ordenados de forma a apresentar os resultados de uma perspectiva global para os aspectos mais particulares. Assim, são inicialmente apresentados os dados resultantes da caracterização fenotípica e genotípica dos isolados e, posteriormente, a sua relação com unidades de captura genética particulares e/ou clones, de modo a explicar a disseminação da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em *Salmonella*.

- **Antunes P., Machado J., Peixe L.** Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in Portuguese *Salmonella enterica* isolates from different sources (*Submetido para publicação*).
- **Antunes P., Machado J., Peixe L.** 2006. Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis?. *Clinical Microbiology and Infection* **12**:1047-1049.
- **Antunes P., Machado J., Sousa J.C., Peixe L.** 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2* and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 836-839.
- **Antunes P., Machado J., Peixe L.** 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**:297-304.
- **Antunes P., Machado J., Sousa J.C., Peixe L.** 2004. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 429-434.
- **Antunes P., Machado J., Peixe L.** 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3'CS region among *Salmonella* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**:1545-1548.

1.6) Referências bibliográficas

- Aarestrup FM, Jensen NE, Jorsal SE, Nielsen TK. Emergence of resistance to fluoroquinolones among bacteria causing infections in food animals in Denmark. *Vet Rec.* 2000; **146**:76-78.
- Aarestrup FM, Wiuff C, Molbak K, Threlfall EJ. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**:827-829.
- Ahmed AM, Nakano H, Shimamoto T. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; **55**:371-374.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* 1999; **59**:183-198.
- Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist.* 2000; **6**:77-83.
- Angulo FJ, Nargund VN, Chiller TC. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004; **51**:374-9.
- Antunes P, Reu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* 2003; **82**:97-103.
- Arcangioli MA, Leroy-Setrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; **174**:327-32.
- Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckaert A, Mulvey MR, White DG. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1945-1954.
- Baggesen, D. L., Sandvang, D., and Aarestrup, F. M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J. Clinical Microbiol.* 2000; **38**:1581-1586.
- Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**:3729-3735.
- Bischoff KM, White DG, Hume ME, Poole TL, Nisbet DJ. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; **243**:285-291.
- Boyd DA, Peters GA, Ng L, Mulvey MR. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; **189**:285-291.

Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 2001; **183**:5725-5732.

Boyd, D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; **46**:1714-1722.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**:2465-2467.

Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**:846-849.

Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1891-1897.

Canton R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; **16**:315-325.

Carattoli A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol.* 2003; **5**:113-122.

Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy CJ, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *J Antimicrob Chemother.* Advance Access published on February 16, 2007; doi:10.1093/jac/dkl547.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport--United States, January-April 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002; **51**:545-548.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2004. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2005a. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with rodents purchased at retail pet stores--United States, December 2003-October 2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2005b; **54**:429-433.

Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother.* 2005; **56**:586-590.

Cloeckaert A, Schwarz S. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet Res.* 2001; **32**:301-310.

Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Demartin M, Weill FX. Variant *Salmonella* genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**:3944-3946.

Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, Imberechts H, Bertrand S, Collard JM, Arlet G, Weill FX. Dissemination of an Extended-Spectrum- β -Lactamase *bla*_{TEM-52} Gene-Carrying IncII Plasmid in Various *Salmonella enterica* Serovars

Isolated from Poultry and Humans in Belgium and France, 2001-2005. *Antimicrob Agents Chemother.* published ahead of print on 26 February 2007, doi:10.1128/AAC.01514-06

Daly M, Villa L, Pezzella C, Fanning S, Carattoli A. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2005; **55**:558-561.

Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*CTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**:2257-2261

Directiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Novembro de 2003, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, que altera a Decisão 90/424/CEE do Conselho e revoga a Directiva 92/117/CEE do Conselho. *Jornal Oficial* nº L 325 de 12/12/2003, p. 31-40.

Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro de 1970, relativa aos aditivos na alimentação para animais. *Jornal Oficial* nº L 270 de 14/12/1970 p. 1-17.

Doublet B, Carattoli A, Whichard JM, White DG, Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *bla*(CMY-2) genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; **233**:301-5.

Dunne EF, Fey PD, Kludt P, Reporter R, Mostashari F, Shillam P, Wicklund J, Miller C, Holland B, Stamey K, Barrett TJ, Rasheed JK, Tenover FC, Ribot EM, Angulo FJ. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA.* 2000 ; **284**:3151-3156.

Ebner P, Garner K, Mathew A. Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGII in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **53**:1004-1009.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of antimicrobials for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal* 2004; **115**:1-76.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards and of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on "Review of the Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004". *The EFSA Journal* 2006; **403**:1-62.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medical Products). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, 1999. EMA/CVMP/342/99-corr-Final. (Online.) <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/regaffair/034299en.pdf> (August 2005, date last accessed).

Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet.* 2001; **357**:1325-1328.

Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**:958-963.

Enter-net. Enter-net annual report 2004; surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond. Enter-net surveillance hub, HPA, Centre for Infections, Colindale, London. 2006.

Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med.* 2000; **342**:1242-1249.

Fisher IS. The Enter-net international surveillance network - how it works. *Euro Surveill.* 1999; **4**:52-55.

Fisher IS; Enter-net participants. Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in western Europe, 1998-2003--results from the Enter-net international salmonella database. *Euro Surveill.* 2004; **9**:43-5.

Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; **43**:1-11.

Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 2004; **10**:272-288.

Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**:3200-3202.

Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 2006; **43**:297-304.

Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR, Funk JA, Altier C. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **53**:997-1003.

Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytia-Trees E, Ribot EM, Swaminathan B; Pulsenet Taskforce. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; **3**:9-19.

Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1937-1944.

Grape M, Sundstrom L, Kronvall G. Sulfonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; **52**:1022-1024.

Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M.C. Mendoza. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**:2166-2169.

Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**:1305-1308.

Guerra, B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne

gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; **46**:2977-2981.

Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; **52**:489-492.

Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist.* 2004a; **10**:83-91.

Guerra B, Junker E, Helmuth R. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004b; **48**:2712-2715.

Hammerum AM, Sandvang D, Andersen SR, Seyfarth AM, Poesbo LJ, Frimodt-Moller N, Heuer OE. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol.* 2006; **106**:235-237.

Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2002; **49**:1011-1014.

Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Molbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella typhimurium*. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**:490-495.

Helms M, Simonsen J, Molbak K. Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. *J Infect Dis.* 2004; **190**:1652-1654.

Helms M, Ethelberg S, Molbak K; DT104 Study Group. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis.* 2005; **11**:859-867.

Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A variant. *Emerg Infect Dis.* 2004; **10**:2225-2227.

Herrero A, Rodicio MR, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**:39-45.

Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 2001; **32**:263-269.

Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA, Cohen ML. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *N Engl J Med.* 1984; **311**:617-622.

Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; **25**:358-373.

Kang MS, Besser TE, Hancock DD, Porwollik S, McClelland M, Call DR. Identification of specific gene sequences conserved in contemporary epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol.* 2006; **72**:6938-6947.

Kang MS, Besser TE, Hancock DD, Call DR. Multiple environmental stress tests show no common phenotypes shared amongst contemporary epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol.* published ahead of print on 2 March 2007, doi:10.1128/AEM.02607-06.

Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **58**:18-22.

Kummerer K. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother.* 2003; **52**:5-7.

Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP, Hall RM. SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; **51**:317-323.

Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103**:19484-9.

Lindstedt B-A, Heir E, Nygard I, Kapperud G. Characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J. Medical Microbiology.* 2003; **52**:141-149.

Lynch M, Painter J, Woodruff R, Braden C; Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1998-2002. *MMWR Surveill Summ.* 2006; **55**:1-42.

Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**:2278-2282.

Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006; **4**:608-20.

McCuddin ZP, Carlson SA, Rasmussen MA, Franklin SK. *Klebsiella* to *Salmonella* gene transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. *Vet Microbiol.* 2006; **31**:114:275-284.

McDermott PF, Zhao S, Wagner DD, Simjee S, Walker RD, White DG. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotechnol.* 2002; **13**:71-84.

McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* 2002; **34** (Suppl 3):S93-S106

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; **5**:607-625.

Michael GB, Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1898-1914.

Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1025-1033.

Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; **23**: 547-555.

Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1923-1930.

Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, Ebbesen JM, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smidt P, Petersen AM, Wegener HC. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *N Engl J Med.* 1999; **341**:1420-1425.

Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1915-1922.

Nógrády, N., I. Gadó, A. Tóth, and J. Pászti. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *International J. Antimicrob. Agents.* 2005; **26**:126-132.

Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2005; **56**:463-469.

Orman BE, Pineiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO, Centron D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**:3963-3970.

Parry CM. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; **16**:467-472.

Pasquali F, Kehrenberg C, Manfreda G, Schwarz S. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. *J Antimicrob Chemother.* 2005; **55**:562-565.

Peirano G, Agero Y, Aarestrup FM, dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 305-309.

Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; **47**:1169-1172.

Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IS, Gill N, Gatto AJ; Salm-gene project. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for. *Euro Surveill.* 2003; **8**:46-50.

Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:903-908.

Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 2004; **53**:28-52.

Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect.* 2001; **3**:237-247.

Randall, L. P., S. W. Cooles, M. K. Osborn, L. J. V. Piddock, and M. J. Woodward. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes

of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **53**:208-216.

Regulamento (CE) n.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Novembro de 2003, relativo ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar. *Jornal Oficial* n.º L 325 de 12/12/2003, p. 1-15.

Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial* n.º L 224 de 18/08/1990 p. 1-8.

Ridley A, Threlfall EJ. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microb Drug Resist.* 1998; **4**:113-118.

Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006; **6**:629-40.

Roy PH. Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microb Today* 1999; **26**:168-170.

Sandvang, D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; **160**:37-41.

Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res.* 2001; **32**:201-225.

Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updates.* 2000; **3**:155-160.

Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 2001; **32**:261-73.

Soto SM, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**:1287-1291.

Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MP, McDonough P, Boor KJ, Wiedmann M. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J Clin Microbiol.* 2005; **43**:3688-3698.

Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001; **7**:382-9.

Swartz MN. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* 2002; **34** (Suppl 3):S111-122.

Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2001; **4**:493-499.

Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Euro Surveill.* 1997; **2**:81-84.

Threlfall EJ. Epidemic *salmonella typhimurium* DT 104--a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother.* 2000; **46**:7-10.

Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; **26**:141-148.

Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill.* 2003; **8**:41-45.

Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; **42**:3053-3058.

van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.* 1999; **58**:589-607.

Varma JK, Molbak K, Barrett TJ, Beebe JL, Jones TF, Rabatsky-Ehr T, Smith KE, Vugia DJ, Chang HG, Angulo FJ. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J Infect Dis.* 2005a; **191**:554-561.

Varma JK, Greene KD, Ovitt J, Barrett TJ, Medalla F, Angulo FJ. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005b; **11**:943-946.

Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res.* 2005; **36**:267-288.

Villa, L, Carattoli A. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; **49**:1194-1197.

Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Gaastra W. A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* Advance Access published on February 9, 2007; doi:10.1093/jac/dkl531

Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis.* 2004; **38** (Suppl 3):S149-156.

White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med.* 2001; **345**:1147-1154.

WHO. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO Meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997. WHO/EMC/ZOO/97.4.

WHO. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting. Geneva, Switzerland, 2-5 June 1998. WHO/EMC/ZDI/98.10.

WHO. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 8th Report 1999-2000. German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), 2003.

Winokur PL, Brueggemann A, DeSalvo DL, Hoffmann L, Apley MD, Uhlenhopp EK, Pfaller MA, Doern GV. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**:2777-2783.

Witte W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol.* 2004; **4**:187-191.

Yates C, Amyes S. Extended-spectrum beta-lactamases in non-typhoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? *J Antimicrob Chemother.* 2005; **56**:262-264.

Zhang Q, Sahin O, McDermott PF, Payot S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect.* 2006; **8**:1972-1978.

Capítulo 2

Epidemiologia da resistência a agentes antimicrobianos em *Salmonella* não tifóide de várias origens

2.1. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in Portuguese *Salmonella enterica* isolates from different sources

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Submetido para publicação

Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in

Portuguese *Salmonella* isolates from different sources

Patrícia Antunes ^{a,b}, Jorge Machado ^c, Luísa Peixe ^{b*}

^a Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200 Porto, Portugal

^b REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^c Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Av^a Padre Cruz, 1600-560 Lisboa, Portugal

*Corresponding author: Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, nº164, 4050-047 Porto, Portugal. Tel: +351 22 2078972; Fax: +351 22 2003977; E-mail: lpeixe@ff.up.pt

Abstract

Resistance was found in 57%, including MDR (multidrug resistance) in 26%, of 1511 Portuguese *Salmonella* isolates collected during 2002-2004 from different sources, mainly associated to foodborne isolates of animal origin. Resistance to nalidixic acid (29%), tetracycline (25%), streptomycin (22%), sulfamethoxazole (22%) and ampicillin (21%) were the most common. Dissemination of resistance genes was observed among the human and foodborne isolates, mainly of animal origin. The prevalence of some resistance genes (*tet*(G), *bla*_{PSE-1} and *bla*_{OXA-30}) was associated to MDR *S. Typhimurium* clonal dissemination. Moreover, horizontal gene transfer seems also to play a significant role in the prevalence of other resistance genes located inside (*aadA1*, *aadA2* and *aadA5*; *dfrA1*, *dfrA12* and *dfrA17*; *cmlA1* and *sul1*), linked (*sul3*) or outside (*bla*_{TEM}, *tet*(A), *tet*(B) and *sul2*) the integron structure.

Keywords: *Salmonella*, antimicrobial agents, resistance genes, food products

1. Introduction

Salmonella enterica is one of the most important zoonotic pathogens, usually considered a leading cause of foodborne diseases. The widespread use of antimicrobial agents in food animal production has contributed to the occurrence of *Salmonella* with decreased susceptibility to antibiotics, which can be transmitted to humans through food products, particularly those of animal origin [1]. Of particular concern is the increasing association of human infections with antimicrobial drug resistant *Salmonella* [1]. An efficient route of acquisition and dissemination of resistant determinants is through horizontally transferable capture genetic units such as plasmids, transposons and gene cassettes inserted into integrons [2]. Taking into account the emergence and spread of resistant *Salmonella* strains observed worldwide, the aim of this study was to determine the prevalence and to characterise the genetic determinants of antimicrobial resistance in Portuguese *Salmonella* isolates from different sources, in order to explain the dissemination of MDR (multidrug resistance) in *Salmonella*.

2. Materials and Methods

This study included 1511 *Salmonella* isolates collected in Portugal between 2002 and 2004. The isolates were recovered from human clinical sources (n=1057); food products (n=350), including poultry (n=128), pork (n=110), beef (n=17), other food types (n=33) and unknown food products (n=62); as well as from the environment (n=92) and unknown sources. The serotypes were determined at the National Center of *Salmonella*. Susceptibility to 10 antimicrobial agents was determined by the agar dilution method, according to the CLSI standards [3]. Susceptibility to β -lactams,

detection of ESBL and determination of the β -lactamases pIs were performed as previously described [4]. The following genes implicated with antimicrobial resistance were detected in the isolates resistant to each antimicrobial agent by PCR [4, 5, 6, 7]: *bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30} and *bla*_{TEM} encoding β -lactam resistance; *floR*, *cmlA1*, and *catA* encoding chloramphenicol resistance; *tet*(A), *tet*(B) and *tet*(G) encoding tetracycline resistance; *sul1*, *sul2* and *sul3* encoding sulphonamide resistance; *aac*(3)-IV and *aphA1* encoding respectively gentamicin and kanamycin resistance. The characterization of genes associated with streptomycin (*aadA*) and trimethoprim (*dfrA*) resistance was searched by PCR amplification and DNA sequencing in isolates carrying those genes inserted into integrons, as described previously [6]. In all the sulfamethoxazole resistant isolates the presence and typing of class 1 and 2 integrons, clonal relationship by PFGE and conjugation assays were performed, as previously described [6]. Isolates with electrophoretic patterns that differed by three bands, at most, were assigned to the same clone, as in previous report [6].

3. Results and discussion

Fifty-seven per cent of the *Salmonella* isolates tested in our study exhibited resistance to at least one antibiotic, with a frequency of 26% for multiresistance (2-8 antibiotics), mainly associated to the foodborne isolates. In fact, several antimicrobial agents are widely used in animal production, namely tetracyclines, β -lactams, aminoglycosides, sulphonamides and quinolones. The most common resistance phenotypes detected were to nalidixic acid (29%), generally linked to poultry products, and to tetracycline (25%), streptomycin (22%), sulfamethoxazole (22%) and ampicillin (21%), mainly associated to pork products, suggesting that the animal reservoir may be



important to the occurrence of resistance in the different serotypes isolated from humans. Resistance to chloramphenicol (13%), trimethoprim (9%), gentamicin (3%) and kanamycin (0.5%) was also observed (Table 1).

Among the antimicrobial-resistant *Salmonella* isolates, resistance genes covering six antimicrobial families were identified: β -lactams (*bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30} and *bla*_{TEM}), aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2* and *aadA5* for streptomycin; *aac(3)-IV* for gentamicin and *aphA1* for kanamycin), phenicols (*catA*, *floR* and *cmlA1*), sulphonamides (*sul1*, *sul2* and *sul3*), tetracycline (*tet(A)*, *tet(B)* and *tet(G)*), and trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA12* and *dfrA17*) (Table 1). Several of the multiple-resistance phenotypes observed were related to the spread of mobile genetic elements such as integrons, with 78% (259/331) of the sulfamethoxazole-resistant isolates carrying one or two class 1 integrons (Table 1). Our results show a wide variety of transmissible antimicrobial resistance mechanisms with all the resistance genes detected disseminated among the human and foodborne isolates, mainly of animal origin.

Our study demonstrates that the prevalence of several resistance genes was associated to clonal dissemination. Two clones disseminated and persisting over time in our country, the MDR DT104 serotype Typhimurium clone and another clone of *S. Typhimurium*, accounts, respectively, for the occurrence of the genes *bla*_{PSE-1} (located in a 1200 bp integron) and *bla*_{OXA-30} (located in a 2000 bp integron) [4, 6]. Also, the presence of *floR* and *tet(G)* genes was mainly or exclusively, respectively, attributed to the prevalence of the DT104 clone, as these genes are known constituents of the SGII MDR region [8]. A particular ability to persist in the animal production environment, such as reduced susceptibility to nitrofurantoin, might have contributed to the emergence of these MDR clones in our country [9]. Nevertheless, it is of note that in Portugal poultry products were not associated with the emergence of the MDR DT104

serotype Typhimurium clone. The presence of the *aac(3)-IV* gene, mainly in two clones of *sul3*-producing *Salmonella*, might be considered other interesting example of selection of particular clones since the AAC(3)-IV enzyme confers resistance to gentamicin and apramycin, an antibiotic used exclusively in veterinary medicine [10], suggesting that the animal production may have contributed to the selection and dissemination of this resistance gene.

Additionally, in our study horizontal gene transfer seems to play a larger role than clonal expansion in the prevalence of other resistance genes. Most of the antibiotic resistance genes are frequently located in gene clusters associated with specific plasmids, transposons or other widely distributed transferable elements, which could explain the presence of several multiresistance patterns. There is evidence that an effective mean of dissemination of several resistance genes was due to its inclusion inside integrons widely spread. This seems to be the case of *aadA* genes, the most frequently integrated gene cassettes in class 1 integrons [6], present in all but two of the isolates carrying integrons, including in 39 considered as streptomycin-susceptible, and found together in 50 isolates. Also, the presence of *dfrA12*, the most prevalent integron-borne dihydrofolate reductase detected, associated to several gene cassette arrays and shared between several clones from the same or different serotype suggest its dissemination through horizontal gene transfer. There is also evidence of dissemination of *dfrA1* gene through specific integrons, although in a lower frequency comparing with other recent studies [11, 12]. The reason for the wide distribution of some integrons with a specific cassette combination is so far unknown, being one explanation the fact that such integrons are stable and could be a part of successful plasmids or transposons with a wide dissemination. An interesting example could be the association of multidrug resistance integrons and virulence determinants in plasmids [5, 13]. Our results also

suggest that the spread of the *sul1* gene, and even more interesting the *sul3* gene, seems to be related to class 1 integrons containing several gene cassettes arrays, including genes less frequently found among *Salmonella* isolates, as the *cmlA1*. In contrast, *sul2* gene is normally associated to small plasmids that appear to confer a fitness advantage on its hosts [14], resulting in an efficient way of persistence, mainly in our *S. Typhimurium* isolates. Also, a wide dissemination was observed for *bla*_{TEM}, *tet*(A) and *tet*(B) genes, located outside the integron structure in isolates with or without different integrons and from several sources, which is suggestive of their horizontal transfer. For the *bla*_{TEM-1} gene its association to different transferable plasmids has been described in several *Salmonella* serotypes [15, 16]. The *tet* efflux genes, which includes *tet*(A) and *tet*(B), are normally part of plasmid-borne transposons in Gram-negative bacteria, most of which are conjugative and belong to different incompatibility groups [17, 18]. For example, *tet*(A) gene localized within a deleted Tn1721 transposon variant located in some cases on conjugative plasmids was widely diffused in *Salmonella* strains circulating in animals in Italy [18]. Besides, as confirmed by our conjugation results, the co-transference in nearly 90% of the cases of *bla*_{TEM}, *tet*(A) and *tet*(B) genes with integrons (Table 1), suggesting that those resistance genes might be located on the same mobile element. These findings evidenced that conjugal plasmids might play a significant role in the emergence of MDR *Salmonella* isolates. However, in contrast with current reports of worldwide dissemination of ESBL-producing *Salmonella* strains [19], generally associated to transferable genetic elements, our ampicillin-resistant isolates remained susceptible to expanded-spectrum cephalosporins. In addition, several transmissible resistance mechanisms to quinolones/fluoroquinolones, such as *qnr* genes have recently been found among Gram -negative bacteria, including *Salmonella* [20]. However, in our study *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB2* or *qnrS1* were not

detected in the 50 nalidixic-acid resistant isolates studied, which include a few ones with class 1 integrons (*unpublished results*). The serotype Enteritidis isolated from poultry products continues to be the main contributor to nalidixic acid resistance in humans, being the mutations in the *gyrA* gene (amino acid substitutions in QRDR region at positions 83 and 87) the major mechanism of resistance to nalidixic acid in *Salmonella* [11, 16].

This study gives baseline information on the magnitude of the resistance problem and its genetic background in Portuguese *Salmonella* from several sources. Food animal production seems to contribute to the emergence of MDR *Salmonella* isolates through the selection and persistence of specific clones and/or the spread of resistance gene clusters among the Gram-negative bacteria sharing the same ecological niche.

Acknowledgements

We are very grateful to Centro Nacional de *Salmonella* (Lisboa, Portugal) for the serotyping of the strains. The present work was partially supported by FSE/FEDER (POCI/AMB/61814/2004).

References

- [1] Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev 2002;26:141-48.
- [2] Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res. 2001;32:243-259.
- [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
- [4] Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2004;54:429-434.
- [5] Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microb Drug Resist 2004;10:83-91.
- [6] Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother 2006;58:297-304.
- [7] Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:836-9.
- [8] Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J Bacteriol 2001; 183:5725-5732.
- [9] Antunes P, Machado J, Peixe L. Illegal use of nitrofurans in food animals: Contribution to human salmonellosis? Clin Microbiol Infect 2006;12:1047-9.
- [10] Jensen VF, Jakobsen L, Emborg HD, Seyfarth AM, Hammerum AM. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006;58:101-7.
- [11] Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J Antimicrob Chemother 2005;56:1025-33.
- [12] Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. J Antimicrob Chemother 2006;58:305-9.
- [13] Villa L, Carattoli A. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence plasmid. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1194-7.
- [14] Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. J Antimicrob Chemother 2004;53:958-63.

- [15] Llanes C, Kirchgesner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2430-6.
- [16] Soto SM, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1287-91.
- [17] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:232-260.
- [18] Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:903-8.
- [19] Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:547-55.
- [20] Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 2006;43:297-304.

Table 1: Prevalence of antimicrobial resistance genes among *Salmonella* isolates

Antimicrobial agent ^a	Resistance Gene	No. (%)	Resistance genes by source			Resistance genes in isolates with integrons		
			Clinical	Food products ^c	Environment	Isolates with integrons	Genes within integrons (co-transference with integrons)	Integron types and clones ^{d,e}
(no. of resistant isolates/%)			n=1057	n=350	n=92	n=259		
AMP (n = 318/21%)								
	<i>bla_{TEM}</i>	200 (63%)	119	71 (S-31, P-19, B-7, U-15)	6	79	0 (16/19)	I-A; II-A,B; III-C; V-F,C,G,H,I,J,U; VI-M; VII-N,O,P,R,X; VIII-T; a-Z,O,un
	<i>bla_{PSE-1}</i>	78 (25%)	60	14 (S-11, B-3)	1	78	78	I-A; IV-A
	<i>bla_{OXA-30}</i>	43 (14%)	32	10 (S-6, P-1, U-3)	1	43	43	VIII-T
CHL (n = 190/13%)								
	<i>catA</i>	55 (29%)	39	15 (S-7, P-5, U-3)	1	55	0 (42/48)	III-D; V-H,I,J,U; VII-N,R; VIII-T
	<i>cmiAI</i>	46 (24%)	29	13 (S-7, P-1, B-2, U-3)	3	46	42	a-A,J,N,O,Q,S,X,Z
	<i>floR</i>	80 (42%)	61	15 (S-11, B-3, U-1)	1	80	0 (1/1)	I-A; VII-O; VIII-T
	Others	13 (7%)	1	11 (S-9, B-1, U-1)	1	11	0 (0/0)	V-G; VI-M; VII-N
GEN (n = 39/3%)								
	<i>aac(3)-IV</i>	31 (79%)	20	7 (S-3, P-1, B-2, U-1)	3	29	0 (0/2)	VII-N,O,X; VIII-T; a-O
	Others	8 (21%)	7	1 (S-1)	0	6	0 (0/3)	I-A; II-B; V-C; VII-R; a-O
KAN (n = 8/1%)								
	<i>aphAI</i>	5 (63%)	3	2 (S-1, B-1)	0	3	0 (2/2)	V-J; VII-P
	Others	3 (38%)	3	0	0	3	0 (0/0)	II-B; VII-O
STR (n = 326/22%) ^b								
	<i>aadAI</i>	94 (29%)	62	27 (S-13, P-6, B-2, U-6)	4	94	94	III-C,D,E; V-C,G,H,I,J,U; VII-O,X; VIII-T; a-A,N,O,Q,S,Z; b-D

<i>aadA2</i>	157 (48%)	95	54 (S-35, P-2, B-10, U-7)	4	157	157	I-A; II-A,B; V-J; VII-N,O,P,R,X; a-A,N,O,Q,S,Z
<i>aadA5</i>	4 (1,2%)	1	3 (S-3)	0	4	4	VI-L,M
<i>aadA2/I</i>	3 (1%)	0	3 (S-3)	0	3	3	a-N
Not tested	108 (33%)	55	31 (S-13, P-11, B-1, O-1, U-5)	18	0		
SUL (n = 331/22 %)							
		204 (19%)	114 (33%)	7 (8%)	259 (100%)		
<i>sulI</i>	252 (76%)	156	87 (S-51, P-11, B-11, O-2, U-12)	5	248	248	I-A; II-A,B; III-C,D,E,T; IV-A; V-F,C,K,G,H,I,J,U,V; VI-L,M; VII-N,O,P,R,X; VIII-T; a-O
<i>sul2</i>	127 (38%)	75	44 (S-20, P-7, B-5, O-1, U-11)	5	57	0 (9/18)	V-C,H,I,U; VII-O,P,R,X; VIII-T; a-O,un
<i>sul3</i>	46 (14%)	25	17 (S-11, P-1, B-2, UN-3)	3	46	45	I-A; II-A; V-J; VII-N,O,X; a-N,Q,S,Z,O
TET (n = 381/25 %)							
		223 (21%)	144 (41%)	8 (9%)	241 (93%)		
<i>tet(A)</i>	179 (47%)	87	85 (S-41, P-17, B-9, O-3, U-15)	5	112	0 (30/34)	II-A,B; III-E; V-F,C,K,G,H,I,V; VI-L,M; VII-N,O,P,R,X; a-N,Z,O
<i>tet(B)</i>	108 (28%)	71	34 (S-22, P-2, U-10)	2	51	0 (38/42)	III-T; V-J; VII-O; VIII-T; a-Q
<i>tet(G)</i>	77 (20%)	59	14 (S-11, B-3)	1	77	0 (0/77)	I-A
Others	18 (5%)	6	12 (S-9, O-1, U-2)	0	1	0 (0/0)	VII-O
TMP (n = 135/9 %)							
		71 (7%)	60 (17%)	3 (3%)	114 (44%)		
<i>dfrA1</i>	38 (28%)	22	16 (S-5, P-8, O-1, U-2)	0	38	38	III-D; V-F,C,G,H,I,J,U,V; b-T
<i>dfrA12</i>	66 (49%)	33	29 (S-18, P-2, B-4, U-5)	3	66	60	I-A; VII-N,O,P,R,X; a-A,N,Q,S,Z
<i>dfrA17</i>	9 (7%)	4	5 (S-4, O-1)	0	9	9	VI-L,M
Not tested	22 (16%)	13	10 (S-6, P-1, U-3)	0	1	0	a-un
NAL (n= 433/29 %)							
		324 (31%)	105 (30%)		21 (8%)	0	I-A; II-A; III-C,E; V-C; VII-O; VIII-T
			S-3, P-69, B-1, O-14, U-18				
CIP (n= 300/20 %)							
		213 (20%)	83 (24%)		13 (5%)	0	I-A; II-A; III-E; V-C; VII-O; VIII-T
			S-3, P-54, B-1, O-11, U-14				

^a, AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; KAN, kanamicin; STR, streptomycin; SUL, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

^b, Streptomycin and trimethoprim resistance genes were only detected as part of integrons.

^c, S, pork products; P, poultry products; B, beef products; O, other food type; U, unknown food product.

^d, Integron types were designated by roman numerals (gene cassettes): IP I, 1000 (*aadA2*) + 1200 (*pse-1*); IP II, 1000 (*aadA2*); IP III, 1000 (*aadA1*); IP IV, 1200 (*pse-1*); IP V, 1700 bp (*dfrA1*, *aadA1*); IP VI, 1800 (*dfrA17*, *aadA5*); IP VII, 2000 (*dfrA12*, *orfF*, *aadA2*); IP VIII, 2000 (*bla_{oxA-30}*, *aadA1*); a, atypical class 1 integrons (*dfrA12*, *orfF*, *aadA2*, *cmlA1*, *aadA1*, *qacH*, *tnp*, *sul3*; *dfrA12*, *orfF*, *aadA2/1*, *qacH*, *tnp*, *sul3*; *estX*, *psp*, *aadA2*, *cmlA1*, *aadA1*, *qacH*, *tnp*, *sul3*); b, class 2 integrons (*dfrA1*, *sat1*, *aadA1*).

^e, Clones were designated by capital letters (serotype): A, Typhimurium DT104; B, Derby; C, Enteritidis; D, Muenchen; E, unknown; F, Heidelberg; G, Brandenburg; H, Saintpaul; I, Saintpaul; J, Typhimurium; K, Enteritidis; L, Bredeney; M, unknown; N, Rissen; O, Typhimurium DT104; P, Enteritidis; Q, Typhimurium; R, Brikama; S, IIIb:65:lv:enxz15; T, Typhimurium; U, Typhimurium; V, Typhimurium; X, Typhimurium DT104; Z, Haifa; un, unknown.

2.2. Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis?

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

***Clinical Microbiology and Infection*, 2006; 12:1047-1049**

Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis?

P. Antunes^{1,2}, J. Machado³ and L. Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, ²REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto and ³Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

ABSTRACT

Recent observations in Portugal of a remarkable incidence (65%) of *Salmonella* isolates from several sources (predominantly human and poultry) with decreased susceptibility to nitrofurantoin (MIC ≥ 64 mg/L), mostly comprising serogroup D isolates of *Salmonella* Enteritidis belonging to different phage types, suggest that illegal use of nitrofurans, especially in the poultry industry, might have contributed to the selection and prevalence of *S. Enteritidis* in food animals, and consequently to human salmonellosis in Portugal. Indiscriminate use of nitrofurans might also be implicated in the emergence of two multiresistant *Salmonella* Typhimurium clones disseminated throughout the country.

Keywords Antimicrobial usage, food animals, nitrofurans, resistance, *Salmonella*, selection

Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1047–1049

Intensive animal production has led to a significant increase in the use of antimicrobial agents for therapeutic, prophylactic and growth promotion purposes in the veterinary field. Any use of antimicrobial agents is a public health concern because of the resulting development, selection and spread of resistance, and the persistence of potentially harmful antimicrobial feed additives in food animal products [1]. Of special concern is the effect of such agents on the selection of particular strains of bacteria implicated in human infections. Consequently, EU member states are required to implement programmes for monitoring zoonoses and zoonotic agents [2], and existing EU legislation concerning food hygiene and control of zoonoses includes a number of provisions that seek to control specified foodborne zoonotic agents that contaminate foodstuffs, including *Salmonella* [3].

Nitrofurans are a large group of compounds that are characterised by a nitro group at position 5 of the furan ring. The most important members of this group include furaltadone, nitrofurantoin, nitrofurazone and furazolidone [4]. Nitrofurans

have been used widely in veterinary medicine because of their broad antimicrobial activity, as well as in human medicine for specific indications [4,5]. Several toxicological studies have reported genotoxic and carcinogenic properties of the nitrofurans, and have established a risk to human health from the occurrence of toxic residues in food products [5]. Consequently, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone were banned from use in food animal production in the EU in 1993 [6], and the use of furazolidone was similarly prohibited in 1995 [7].

In 2002, a new method for detecting nitrofurans residues, with a greater sensitivity and specificity for detection of these compounds in food animal products, was introduced in Portugal and other European countries. The increase in the sensitivity of detection led to the nitrofurans crisis in Portugal during 2002–2003, with evidence of illegal abuse of these compounds, mainly in poultry production farms [5].

Salmonella is one of the major causes of foodborne disease in humans in Europe, and is associated mainly with the consumption of contaminated poultry meat and products [8]. The most frequently reported serotypes involved in human salmonellosis in the EU in 2002 were *Salmonella* Enteritidis (67%) and *Salmonella* Typhimurium (17%) [8]. *S. Enteritidis* is wide-

Corresponding author and reprint requests: L. Peixe, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, no. 164, 4050-047 Porto, Portugal
E-mail: lpeixe@ff.up.pt

spread in poultry production throughout Europe, including in Portugal, where one study showed that 44% of *Salmonella* isolates from poultry samples were of the *S. Enteritidis* serotype [9]. In contrast, *S. Typhimurium* has a more ubiquitous host range, and is associated with pigs and cattle as well as poultry [10].

Salmonella is naturally susceptible to nitrofurans [11], but a study of 1183 non-typhoid *Salmonella* isolates from human and non-human sources (867 human clinical isolates, 98 isolates from poultry products, 122 isolates from other food types, 38 isolates from unknown food sources and 58 isolates from the environment) collected in Portugal during 2002–2003 revealed a remarkable proportion of isolates (65%) with decreased susceptibility to nitrofurantoin (MIC ≥ 64 mg/L), as determined by the agar dilution method [12] (Table 1). The strain collection was obtained from the National Centre of *Salmonella* (INSA, Lisboa, Portugal) and from geographically dispersed clinical and food microbiology laboratories. The serotypes and phage types were determined at the National Centre of *Salmonella*. Resistance to other antimicrobial agents was also observed (31% nalidixic acid, 19% tetracycline, 18% streptomycin, 17% sulphamethoxazole, 17% ampicillin, 9% chloramphenicol, 7% trimethoprim, 1% gentamicin and 0.2% kanamycin) [13]. Different rates of resistance to nitrofurantoin were observed in isolates from poultry ($n = 65/98$; 66%) and in clinical isolates from humans ($n = 618/867$; 71%) as compared with isolates from food products other than poultry ($n = 50/122$; 41%) and from the environment ($n = 12/58$; 21%). Decreased susceptibility to nitrofurantoin was most common among serogroup D isolates, mainly *S. Enteritidis*, which is the serotype associated most frequently with human infection in Europe [14]. In humans, 90% of isolates with decreased susceptibility to nitro-

furantoin belonged to serogroup D, mainly *S. Enteritidis* (26 phage types among 385 isolates tested). Similarly, in poultry, 83% of isolates with decreased susceptibility to nitrofurantoin belonged to serogroup D, mainly *S. Enteritidis* (seven phage types among 14 isolates tested, which were also observed among the human isolates). Nitrofurantoin resistance in *S. Enteritidis* was more frequent than in other serogroups, suggesting that illegal use of nitrofurans in poultry production may have contributed to the high prevalence of *S. Enteritidis* in poultry and consequently in human infection.

Previous findings have also suggested a link between resistance to nitrofurans in human *Salmonella* isolates and the food chain. According to Rampling *et al.* [15], the authorisation for veterinary use of nitrofurans in the UK during the 1990s, including in poultry husbandry, may have played a role in the dissemination of *S. Enteritidis* PT4, the organism responsible for the increase in human salmonellosis in the UK. In contrast, all *S. Enteritidis* isolates tested in Australia, where the use of nitrofurans was phased out in the poultry industry, were susceptible to nitrofurans. Australia is a country that has not experienced an increase in human infections involving *S. Enteritidis*, and where clinical cases have not been linked to consumption of any particular food product [16].

Interestingly, decreased susceptibility to nitrofurantoin was also observed among *S. Typhimurium* multiresistant isolates obtained from geographically dispersed clinical and food sources in Portugal. It is likely that illegal veterinary use of nitrofurans occurred in food animal production units other than those producing poultry (where use was detected by the Portuguese authorities [5]), and that this may have contributed to the emergence and persistence of the two multiresistant *S. Typhimurium* clones that are widespread in Portugal: one carrying a 2000-bp integron with *bla*_{oxa-30}-*aadA1* [17], and the *S. Typhimurium* DT104 clone carrying 1000-bp (*aadA2*) and 1200-bp (*blaPSE-1*) class 1 integrons [13].

These observations highlight another problem related to antibiotic usage in food animal production, in that the widespread use of nitrofurans might also be involved in the selection and persistence of *Salmonella* in animals used for food production. As a consequence, the intensive

Table 1. MICs of nitrofurantoin for *Salmonella* isolates from different sources

Source	<i>n</i>	No. of isolates with nitrofurantoin MIC (mg/L) of						
		4	8	16	32	64	128	>128
Clinical (human)	867	2	8	43	196	477	137	4
Poultry	98	0	0	7	25	58	8	0
Other foods	122	1	6	26	39	43	6	1
Unknown foods	38	0	1	6	9	17	5	0
Environment	58	0	1	22	23	6	6	0

Escherichia coli ATCC 25922 was used as a reference strain (MIC 8 mg/L).

use of nitrofurans in Portugal, especially in the poultry industry, might have favoured a high incidence of *S. Enteritidis* in humans and influenced the emergence of the two multiresistant *S. Typhimurium* clones that are disseminated throughout the country. The use of antimicrobial agents in food animal production should be strongly discouraged because of the public health risks associated with the development, selection and spread of resistance.

REFERENCES

1. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Product Sci* 1999; **59**: 183–198.
2. European Commission. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. *Official J L* 2003; **325**: 31–40.
3. European Commission. Regulation 2160/2003/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. *Official J L* 2003; **325**: 1–15.
4. McCalla DR. Nitrofurans. In: Hahn FE, ed., *Antibiotics*, vol 1, 1st edn. New York: Springer-Verlag, 1979; 176–213.
5. Direcção Geral de Veterinária. Resíduos de nitrofuranos em Portugal—relatório final. http://www.portugal.gov.pt/NR/rdonlyres/299304BC-3680-42C5-86F1-B63EE-FE66A41/0/Relatorio_Nitrofuranos.pdf
6. European Commission. Regulation 2901/93/EEC of the Council of 18 October 1993 on amending Annexes I, II, III and IV to Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food-stuffs of animal origin. *Official J L* 2003; **264**: 1–4.
7. European Commission. Regulation 1442/95/EC of the Commission of 26 June on amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food-stuffs of animal origin. *Official J L* 1995; **138**: 26–30.
8. Anonymous. Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the Commission related to the use of antimicrobials for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA J* 2004; **115**: 1–76.
9. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 2003; **82**: 97–103.
10. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002; **26**: 141–148.
11. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *Int J Antimicrob Agents*, 2000; **16**: 211–217.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 6th edn. Approved standard M7-A6. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
13. Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 58: 297–304.
14. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C *et al.* Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Eurosurveillance* 2003; **8**: 41–45.
15. Rampling A, Upson R, Brown DFJ. Nitrofurantoin resistance in isolates of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from poultry and humans. *J Antimicrob Chemother* 1990; **25**: 285–290.
16. Cox JM, Brook MD, Woolcock JB. Sensitivity of Australian isolates of *Salmonella enteritidis* to nitrofurantoin and furazolidone. *Vet Microbiol* 1996; **49**: 305–308.
17. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 429–434.

2.3. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2* and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, João Carlos Sousa², Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

***Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2005; 49:836-839**

Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons

Patrícia Antunes,^{1,2} Jorge Machado,³ João Carlos Sousa,² and Luísa Peixe^{2*}

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação¹ and Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia,² Universidade do Porto, Porto, and Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon,³ Portugal

Received 5 July 2004/Returned for modification 16 September 2004/Accepted 17 October 2004

In 200 sulfonamide-resistant Portuguese *Salmonella* isolates, 152 *sul1*, 74 *sul2*, and 14 *sul3* genes were detected. Class 1 integrons were always associated with *sul* genes, including *sul3* alone in some isolates. The *sul3* gene has been identified in isolates from different sources and serotypes, which also carried a class 1 integron with *aadA* and *dfrA* gene cassettes.

Salmonella enterica is a zoonotic pathogen transmitted through the food chain to humans, with contaminated foods of animal origin being important sources of infection. In particular, *S. enterica* serotype Typhimurium definitive phage type 104 (DT104), with resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides, and tetracyclines (R-type ACSSuT), has emerged as a global health problem. The use of antimicrobial agents in food animals has been a major factor in the emergence of *Salmonella* with decreased susceptibility to antibiotics (19). A basic role in the spread of antimicrobial resistance in *Salmonella* has been attributed to class 1 (6, 17) and class 2 (4, 13) integrons. Sulfonamide resistance in gram-negative bacilli generally arises from the acquisition of either of the two genes *sul1* and *sul2*, encoding forms of dihydropteroate synthase that are not inhibited by the drug (2). The *sul1* gene is normally found linked to other resistance genes in class 1 integrons, while *sul2* is usually located on small nonconjugative plasmids (18) or large transmissible multiresistance plasmids (2). Recently, a new plasmid-borne sulfonamide resistance gene called *sul3* has been discovered (15). The objective of this study was to evaluate the incidence of sulfonamide resistance genes and class 1 and class 2 integrons among sulfamethoxazole-resistant nontyphoidal *Salmonella* isolates from different sources in Portugal.

For this study all the sulfonamide-resistant isolates (200) from a total of 1,183 Portuguese *Salmonella* isolates apparently epidemiologically unrelated collected during 2002 and 2003 were selected. The strain collection was obtained from the National Center of *Salmonella* (Lisbon, Portugal) and from clinical and food microbiology laboratories dispersed in our country. The MIC of sulfamethoxazole was determined by the agar dilution method, according to the NCCLS (12), with Mueller-Hinton agar 2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The breakpoint used was the one defined by the NCCLS (12) for the family *Enterobacteriaceae* (≥ 512 $\mu\text{g/ml}$). These 200 isolates were recovered from human clinical sources (120), food products (73), the environment (five), and unknown

sources (two) and belong to several serogroups, principally B, C, and D. By a PCR assay performed according to the work of Pritchett et al. (16), all the *Salmonella* isolates contained the *invA* gene and 66 were identified as belonging to the DT104 phage type. Clonality among the isolates was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) following XbaI digestion of genomic DNA according to the standard 1-day protocol set by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1). Isolates with electrophoretic patterns that differed by three bands at most were assigned to the same clone.

All the sulfonamide-resistant isolates were screened by PCRs, which were performed with primers specific for *sul1* (9), *sul2* (9), and *sul3* (15) genes. In 200 sulfonamide-resistant isolates, 152 (76%) *sul1*, 74 (37%) *sul2*, and 14 (7%) *sul3* genes were detected. In 34 isolates, more than one gene coding for sulfonamide resistance was present: *sul1* and *sul2* in 24; *sul1* and *sul3* in four; and *sul1*, *sul2*, and *sul3* in six (Table 1). The sequencing data from one of the PCR products obtained with primers for the *sul3* gene showed identity with the newly described *sul3* gene (15). The 14 *sul3*-positive *Salmonella* isolates were from human clinical samples (six), from foods of animal origin (six), and from environmental sources (two), obtained from geographically dispersed regions in Portugal and belonging to three *Salmonella* serotypes. The PFGE profiles showed one clone which includes the four *S. enterica* serotype Rissen isolates, all from swine end products, and three clones were identified among the nine serotype Typhimurium isolates, with one of them carrying *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes isolated from swine end products, humans, and the environment (Table 2; Fig. 1).

The presence of class 1 integrons was tested by PCR, with the primers 5'CS-3'CS (10) and the specific primer *int1* (9) in all the sulfamethoxazole-resistant isolates. To characterize the conserved segment 3'CS, the presence of *sul1* and *qacEA1* genes was determined in all the isolates by PCR, with specific primers (17). To determine the content of the variable regions of the integrons, sequencing and PCR with the 5'CS primer in combination with reverse primers for several genes were performed. Class 2 integrons were detected by PCR with primers specific for *int2* (11). PCR analysis revealed that, of 200 sulfonamide-resistant isolates, 149 (75%) contained class 1 inte-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, n°164, 4050-047 Porto, Portugal. Phone: 351 22 2078972. Fax: 351 22 2003977. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

TABLE 1. Distribution of sulfonamide resistance genes in *Salmonella* isolates and relation to class 1 and class 2 integrons

Strain characteristic (n)	No. of isolates with gene(s):					
	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
Sulfonamide resistance (200)	118	44	4	24	4	6
Class 1 integron (149)	112	1	4	22	4	6
Class 1 and 2 integrons (5)	4	0	0	1	0	0

grons and 5 (3%) contained class 1 and class 2 integrons (Table 1). Five of the sulfamethoxazole-resistant strains carried class 1 integrons, which lacked the *qacEΔ1* and *sul1* genes at the 3'CS.

Among the 154 isolates carrying class 1 integrons, 149 presented the *sul1* gene, found alone (116 isolates) or simultaneously with *sul2* (23 isolates) or *sul3* (four isolates) and with *sul2* and *sul3* (six isolates) (Table 1). In the five strains with class 1 integrons, which lacked the *qacEΔ1* and *sul1* genes, four carried a *sul3* gene and the other one carried a *sul2* gene. The *sul1* gene is frequently located on class 1 integrons, which could be confirmed by the fact that, of the 152 *sul1*-positive isolates, 149 (98%) harbored class 1 integrons. Interestingly, the *sul3* gene occurs in *Salmonella* isolates carrying class 1 integrons, with identical cassette genes (*dfrA12* and *aadA2*) in all but one isolate (*dfrA1* and *aadA1*), which confer resistance to the same antimicrobial agents (Table 2).

Conjugation assays on an agar plate were carried out with the recipient strain *Escherichia coli* K802N. Transconjugants were selected on Mueller-Hinton agar 2 (bioMérieux) containing sulfamethoxazole (256 µg/ml) plus nalidixic acid (64 µg/ml). Sulfonamide resistance was transferred from 6 out of the 14 *sul3*-positive isolates; transconjugants were confirmed by

PCR specific for *sul3*. Resistance to other antimicrobial agents and class 1 integrons was also cotransferred in those isolates (Table 2).

Class 1 integrons and sulfonamide resistance genes are disseminated among *Salmonella* in contrast with class 2 integrons. A significant proportion (77%) of isolates resistant to sulfonamides carried class 1 integrons; in nearly all cases (98%) the *sul1* gene was a consistent marker for the presence of this class of integrons. The presence in all isolates with class 1 integrons of at least one of the *sul* genes provides, when bacteria are submitted to selective pressure by sulfonamides, a useful tool for the maintenance and further extension of resistance to other antimicrobial agents.

In our *Salmonella* isolates the *sul1* gene was the most frequent mechanism of resistance to sulfonamides. In contrast, recently the spread of *sul2* seems to have increased in other European countries (2, 9), as the gene was reported to be more widespread among clinical isolates of *E. coli* than the *sul1* gene.

A new sulfonamide resistance gene, named *sul3*, has been detected in *E. coli* isolates from pigs in Switzerland (15) and also among German *E. coli* isolates from various animals and foods (7) and *Salmonella* isolates (8). The *sul3* gene was also identified in two different human clinical isolates of *E. coli* in Sweden (5). In our study, the newly described *sul3* gene has now been identified in 14 *Salmonella* isolates from three serotypes collected from human and nonhuman sources in Portugal, being mainly observed in isolates from swine food products. The consumption of sulfonamides for veterinary use is generally widespread in Portugal, particularly for swine production. So, the appearance of a newly described gene and the simultaneous presence of several *sul* genes may reflect its high usage in food-producing animals, as verified in our country by Pena et al. (14). The association of *sul3* genes with conjugative plasmids in the food-borne isolates of the serotype Rissen clone and serotype Typhimurium and in one human *Salmo-*

TABLE 2. Characterization of *Salmonella* isolates with the *sul3* gene

Serotype and isolate (phage type)	PFGE type ^a	Isolation date/area of Portugal	Source	Class 1 integron genes ^b	<i>sul</i> gene(s) ^b
Rissen					
SFCL-5	A	July 2002/north	Swine product	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>
BF033	A	October 2002/north	Swine product	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>
SFS-2	A2	2002/north	Sausage	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	<i>sul3</i>
BF128	A2	August 2003/north	Swine product	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>
Typhimurium					
IH459/02 (DT104)	B	August 2002/south	Human (hospital 1)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
AF30 (DT104)	B3	May 2003/south	Swine product	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
IE352/03 (DT104)	B3	June 2003/north	Seawater (beach 1)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
IE357/03 (DT104)	B3	June 2003/north	Seawater (beach 2)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
IH752/03 (DT104)	B3'	2003/south	Human (hospital 2)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
IH779/03 (DT104)	B3''	2003/north	Human (hospital 3)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
IH184/03	C	April 2003/north	Human (hospital 4)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	<i>sul3</i>
BH212	C	2003/north	Human (hospital 5)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	<i>sul3</i>
AF29	D	May 2003/south	Swine product	<i>int1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>
IIIb:65:lv:enxz15					
IH842/03	E	2003/south	Human (hospital 6)	<i>int1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	<i>sul3</i>

^a Clones are designated by capital letters, and subtypes are defined by a subindex that indicates the number of bands that differ from the strain considered to be the initial PFGE type.

^b Resistance genes produced in transconjugants appear in boldface.

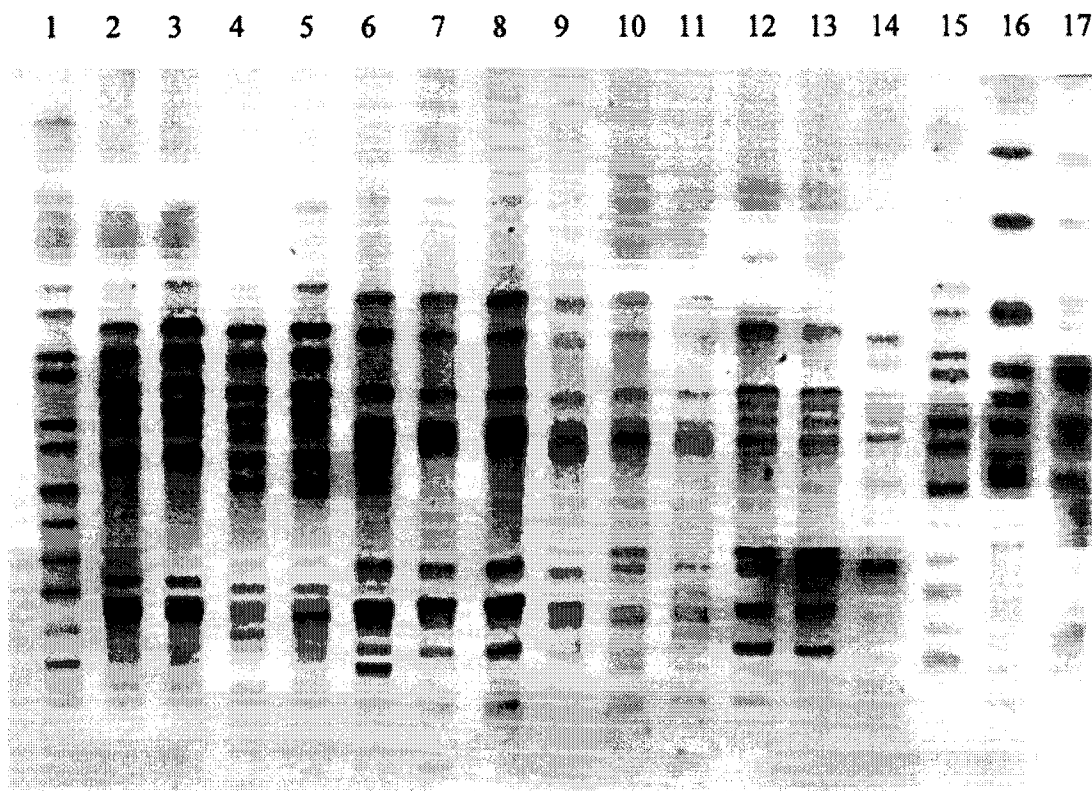


FIG. 1. PFGE patterns of *sul3*-carrying *Salmonella* isolates. Lanes: 1, 15, and 17, *Salmonella* serotype Braenderup H9812 (CDC); 2, SFCL-5 (type A); 3, BF033 (type A); 4, SFS-2 (subtype A2); 5, BF128 (subtype A2); 6, IH459/02 (type B); 7, AF30 (subtype B3); 8, IE352/03 (subtype B3); 9, IE357/03 (subtype B3); 10, IH752/03 (subtype B3'); 11, IH779/03 (subtype B3''); 12, IH184/03 (type C); 13, BH212 (type C); 14, AF29 (type D); 16, IH842/03 (type E).

nella isolate of another serotype could facilitate the further spread of this gene to other bacteria.

Interestingly, the *sul3* gene occurs in *Salmonella* carrying class 1 integrons with *aadA* and *dfrA* gene cassettes, which allows isolates to survive exposure to sulfamethoxazole and trimethoprim, a combination frequently used in therapeutics. It is of note that serotype Typhimurium was the main serotype carrying the *sul3* gene and the only serotype associated with the three *sul* genes. The persistence of several sulfonamide resistance genes may be the result of the successive pressure exerted by sulfonamides and other antimicrobial agents that are also commonly used and may be mitigated by the fact that not all sulfonamide-resistant determinants exert a fitness cost, as described for the *sul2*-encoding plasmid (3).

We are very grateful to V. Perreten (Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Bern, Switzerland) for the control strain with plasmid pVP440, Centro Nacional de *Salmonella* (Lisbon, Portugal) for serotyping of the strains, and CDC for the PFGE protocols and the control strain *S. enterica* serotype Braenderup H9812.

This work was partially supported by Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal (project no. 49975).

REFERENCES

- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. One-day (24-48h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PulseNet PFGE manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Enne, V. I., D. M. Livermore, P. Stephens, and L. M. C. Hall. 2001. Persistence of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357:1325-1328.
- Enne, V. I., P. M. Bennett, D. M. Livermore, and L. M. C. Hall. 2004. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p913 in the absence of selective pressure. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:958-963.
- Goldstein, C., M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A. O. Summers, D. G. White, and J. Maurer. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrons in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:723-726.
- Grape, M., L. Sundstrom, and G. Kronvall. 2003. Sulfonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:1022-1024.
- Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M. C. Mendoza. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2166-2169.
- Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:489-492.
- Guerra, B., E. Junker, and R. Helmuth. 2004. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2712-2715.
- Kern, M. B., T. Klemmensen, N. Frimodt-Moller, and F. Espersen. 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulfonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:513-516.
- Lévesque, C., L. Piché, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191.
- Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1568-1574.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

13. Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centrón. 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3963–3970.
14. Pena, A., C. Serrano, C. Réu, L. Baeta, V. Calderón, I. Silveira, J. C. Sousa, and L. Peixe. 2004. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Addit. Contam.* **21**:749–755.
15. Perreten, V., and P. Boerlin. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1169–1172.
16. Pritchett, L. C., M. E. Konkel, J. M. Gay, and T. E. Besser. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3484–3488.
17. Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:37–41.
18. Skold, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updates* **3**:155–160.
19. Threlfall, E. J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:141–148.

2.4. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

***Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006; 58:297-304**

Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³ and Luísa Peixe^{2*}

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

²REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal; ³Centro Nacional de Salmonella, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Received 24 February 2006; returned 27 March 2006; revised 10 May 2006; accepted 17 May 2006

Objectives: The antimicrobial resistance profiles of 1183 *Salmonella* isolates collected during 2002–2003 from several sources (human, food products and environment) were evaluated. The occurrence, distribution and cassette content of class 1 and 2 integrons among the sulphonamide-resistant population, as well as the role of particular clones to the spread of these genetic elements, were investigated.

Methods: The isolates were examined for susceptibility to antimicrobial agents. The characterization of class 1 and 2 integrons was investigated using PCR, PCR–RFLP (restriction fragment length polymorphism) and sequencing in the sulphonamide-resistant isolates. Conjugation assays and clonality analysis by PFGE were performed.

Results: The most common resistance phenotypes were to nalidixic acid, tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole and ampicillin (ranging from 31% to 17%). Resistance to sulphonamides ($n = 200$) was associated with resistance to other antimicrobial agents, with 75% of the isolates carrying one or two class 1 integrons while only 3% simultaneously carried class 1 and 2 integrons. Integrons were observed among at least 11 serotypes (mainly Typhimurium) and in a reduced number of PFGE clones (20). Eight class 1 integron types were found, with the *aadA* genes (*aadA1*, *aadA2* and *aadA5*) alone or downstream of a trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA12* and *dfrA17*) or a β -lactamase resistance gene (*bla*_{OXA-30}) and the *bla*_{PSE-1} gene alone. Most of the class 1 integron types were shared by several clones from the same or different serotypes obtained either from humans or food products of animal origin, especially pork products. However, some Typhimurium-specific integrons were found: *aadA2* plus *bla*_{PSE-1} and *bla*_{OXA-30}–*aadA1*.

Conclusions: Apart from the hypothetical contribution of the conjugative transfer of integrons, the incidence of *Salmonella* carrying these genetic units seems to rely on the ability of certain clones to spread or persist in particular animal niches. Our data suggest that food-producing animals might be simultaneously considered as a reservoir of clones and integrons carrying antibiotic resistance genes, thus making the food chain, especially pork products, a possible source of multidrug-resistant isolates in humans.

Keywords: multidrug resistance, gene cassettes, PFGE, food safety

Introduction

Bacterial antimicrobial resistance has become a worldwide public health problem with direct impact on food safety, being crucial the monitoring of food-borne pathogens that possess important

animal reservoirs, such as *Salmonella*, as proposed by the EU legislation.¹

Salmonellosis is one of the most frequent food-borne diseases in almost all industrialized countries. The widespread use of antimicrobial agents in food-animal production has contributed

*Corresponding author. Tel: +351-22-2078972; Fax: +351-22-2003977; E-mail: lpeixe@ff.up.pt

to the occurrence of *Salmonella* with decreased susceptibility to antibiotics, which can be transmitted to humans through food products, particularly those of animal origin.² The increasing number of infections with antimicrobial drug-resistant *Salmonella*, including the emergence of multidrug-resistant (MDR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104,² extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Salmonella*^{3,4} and fluoroquinolone-resistant *Salmonella* strains,^{2,5} deserves special attention. The formation of genetic elements that cointegrate antibiotic resistance and virulence determinants, which may compromise the therapeutic options in cases of invasive *Salmonella* infections, is also part of a worrisome trend.⁴

Several of the antibiotic resistance genes observed in Gram-negative microorganisms are part of a gene cassette inserted in an integron.^{6,7} The most common cassettes contain genes that confer resistance to a range of antimicrobial agents, including aminoglycosides, β -lactams, chloramphenicol and trimethoprim, as well as genes that confer resistance to antiseptics and disinfectants.^{6,7} Several classes of integrons related to antibiotic resistance have been identified that can be distinguished by the nucleotide sequence of their respective integrase.⁷ Through incorporation into transposons and plasmids, integrons participate in the capture and dissemination of resistance genes among bacteria. The fact that genes yielding resistance to antibiotics commonly used in the treatment of human infections could be acquired by integron-harboring strains may potentiate the possibilities of selection by a variety of different antimicrobials. Therefore, integron acquisition is considered the major cause of multiple resistance in Gram-negative microorganisms, mainly in enteric bacteria.^{7,8}

Although several class 1 and 2 integrons have been identified in different *Salmonella* serotypes,^{9–17} the study of the dissemination of these elements among *Salmonella* obtained from different sources (clinical, foods and environmental samples) has not been currently explored. In addition, the contribution of clonal spread to the incidence of *Salmonella* carrying these genetic elements has been scarcely described. In the present study, the antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates collected during 2002–2003 from several sources (human clinical samples, food products and environmental samples) were evaluated. Moreover, the occurrence, distribution and cassette content of class 1 and 2 integrons among the sulphonamide-resistant population were investigated along with the role of particular clones to the spread of these genetic elements.

Materials and methods

Bacterial strains

The study included 1183 *Salmonella* isolates collected in Portugal, during 2002–2003. The isolates were recovered from human clinical sources (867); food products (258), including poultry (98), pork (85), beef (10), other food types (27) and unknown sources (38); as well as from the environment (58). The strain collection was obtained from the National Centre of *Salmonella* (INSA, Lisboa, Portugal) and from geographically dispersed clinical and food microbiology laboratories. The serotypes were determined at the National Centre of *Salmonella*. A PCR assay for the identification of *S. enterica* serotype Typhimurium DT104 and U302 phage types was conducted according to Pritchett *et al.*¹⁸

Antimicrobial susceptibility testing

The MICs of 10 antimicrobial agents (streptomycin, kanamycin, gentamicin, ampicillin, nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline, sulfamethoxazole and trimethoprim) were determined by the agar dilution method, according to the CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute),¹⁹ using Mueller–Hinton agar 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The breakpoints used were those defined by the CLSI for Enterobacteriaceae,¹⁹ with the exception of streptomycin.²⁰ *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the reference strain.¹⁹ In all the ampicillin-resistant isolates a double-disc synergy test for the detection of ESBL production was performed by the disc diffusion method²¹ with an amoxicillin/clavulanic acid disc placed next to ceftazidime, cefotaxime, cefuroxime, aztreonam, ceftriaxone and cefepime discs on Mueller–Hinton agar 2 (bioMérieux).

Detection of class 1 and class 2 integrons

The presence of class 1 integrons was tested by PCR (Table 1), using the primers 5'CS–3'CS²² and the specific primer for the *int1* gene²³ in all the sulfamethoxazole-resistant isolates. To characterize the conserved segment 3'CS, a PCR, using specific primers,²⁴ was performed to determine the presence of *sul1* and *qacEA1* genes in all those isolates. Class 2 integrons were detected by PCR (Table 1) with specific primers for the *int2* gene,²⁵ and subsequently the cassette regions were amplified using primers hep74 and hep51 for the *attI2-orfX* region.²⁶

Characterization of class 1 and class 2 integrons

To determine the content of the variable regions of the class 1 integrons, first the 5'CS primer was used in combination with reverse

Table 1. Primer sequences for PCR assays used in the study

Name	Sequence (5'→3')	Reference
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	22
3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	22
qacEA1 F	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	24
sul1 R	GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC	24
ant (3'')-Ia R	ATT GCC CAG TCG GCA GCG	24
pse-1 R	CTG GTT CAT TTC AGA TAG CG	24
dhfrI R	AGC TGT TCA CCT TTG GC	22
dfrA12	GCA TTG GGA AGA AGG CGT CAC	38
oxa-III R	TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG	39
DT104 F	GTC AGC AGT GTA TGG AGC GA	18
DT104 R	AGT AGC GCC AGG ACT CGT TA	18
inva-1	ACA GTG CTC GTT TAC GAC	18
	CTG AAT	
inva-2	AGA CGA CTG GTA CTG	18
	ATC GAT AAT	
int1 F	GCC ACT GCG CCG TTA CCA CC	23
int1 R	GGC CGA GCA GAT CCT GCA CG	23
int2 F	CAC GGA TAT GCG ACA AAA	25
	AGG T	
int2 R	GTA GCA AAC GAG TGA CGA	25
	AAT G	
hep74	CGG GAT CCC GGA CGG	26
	CAT GCA CGA TTT GTA	
hep51	GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG	26

Antimicrobial resistance and integrons in *Salmonella*

primers for several antibiotic resistance genes (Table 1). Second, typing of each class 1 and class 2 integron was performed by a PCR-RFLP analysis. PCR products corresponding to the amplification of the 5'CS-3'CS region of the class 1 integrons, and of the *attI2-orfX* region of the class 2 integrons, were purified using the GFX PCR DNA and gel band kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and further digested with 5 U of *TaqI* endonuclease (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). The restriction products were analysed by electrophoresis on 2% agarose gels. Integron types were designated by roman numerals. Third, PCR products representing the different amplicons were sequenced by the dideoxy-chain termination method with an ALF Express automatic DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Obtained sequences were compared with those registered in GenBank, using the Blast program.

PFGE

Clonality among isolates was assessed by PFGE following *XbaI* digestion of genomic DNA according to the standard 1 day protocol of the CDC.²⁷ DNA fragments were subjected to PFGE in agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex BioScience Rockland, Inc., USA) (1.2%, w/v) in 0.5× TBE buffer in a CHEF-DR III system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), with the following running conditions: 6 V/cm at 14°C, 120°, with pulse times from 2.2 to 63.8 s for 19 h. The addition of thiourea (10 mg/mL) to 0.5× TBE buffer was performed in PFGE of non-typeable strains.²⁷ Genomic DNA from *Salmonella* serotype Braenderup H9812, obtained from the CDC, was also restricted with *XbaI* and used as a molecular size marker. Isolates with electrophoretic patterns that differed by three bands, at most, were assigned to the same clone, as in a previous report.²⁸ Clones were designated by capital letters and subtypes were defined by a subindex that indicates the number of bands that differed from the strain considered to be the initial PFGE type.

Conjugation assays

Conjugative transfer of plasmids from *Salmonella* isolates into *E. coli* K802N (nalidixic acid and rifampicin resistant) was attempted using agar plates. Transconjugants were selected on Mueller-Hinton agar 2 (bioMérieux) plates containing sulfamethoxazole (256 mg/L) plus

nalidixic acid (64 mg/L) (or 100 mg/L rifampicin if the donor was nalidixic acid resistant).

Results

Antimicrobial susceptibility

Forty-six per cent of the isolates were susceptible to all tested antimicrobial agents, 33% were resistant to a single antibiotic and 21% were multiresistant (ranging from 2–8 antibiotics). This high incidence of resistance was observed in isolates from all sources: a total of 178 out of 258 food-borne isolates (69%), 437 out of 867 human clinical isolates (50%) and 18 out of 58 environmental isolates (31%). The most common resistance phenotypes detected were to nalidixic acid (31%), tetracycline (19%), streptomycin (18%), sulfamethoxazole (17%) and ampicillin (17%). It is important to note that some of the ampicillin-resistant isolates also exhibited reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanate, but remained susceptible to expanded-spectrum cephalosporins. Resistance to chloramphenicol (9%), trimethoprim (7%), gentamicin (1%) and kanamycin (0.2%) was also observed (Table 2). In general, the incidence of resistance to the tested antibiotics was higher among the food-borne isolates than among those of human origin, mainly to tetracycline, streptomycin and sulphonamides. It should be noted that 69 (22%) isolates from non-human origin and 176 (20%) from clinical samples with resistance to nalidixic acid also exhibited decreased susceptibility to ciprofloxacin (MIC 0.25–0.5 mg/L).

Class 1 integrons

Resistance to sulphonamides was associated with resistance to other antimicrobial agents, a fact observed in 200 out of the 243 MDR isolates. Of the sulfamethoxazole-resistant strains 77% (*n* = 154) carried one or two class 1 integrons, with detection of resistance genes in variable regions of integrons in 150 (75%) of those isolates. In four isolates the array of gene cassettes was undetermined. Integrons were detected in 79% (59/75), 77% (93/121) and 50% (2/4) of food product, human

Table 2. Frequency of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from different sources

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)	Number (%) of isolates resistant to antimicrobial agents			
		clinical (<i>n</i> = 867)	food products (<i>n</i> = 258)	environment (<i>n</i> = 58)	total (<i>n</i> = 1183)
STR	≥32 ^a	115 (13)	78 (30)	13 (22)	206 (17)
GEN	≥16 ^b	11 (1)	4 (1)	2 (3)	17 (1)
KAN	≥64 ^b	1 (0.1)	1 (0.4)	0 (0)	2 (0.2)
AMP	≥32 ^b	132 (15)	67 (26)	5 (9)	204 (17)
NAL	≥32 ^b	278 (32)	79 (31)	4 (7)	361 (31)
CIP	>0.125 ^c	176 (20)	65 (25)	4 (7)	245 (21)
CHL	≥32 ^b	68 (8)	35 (14)	3 (5)	106 (9)
TET	≥16 ^b	129 (15)	96 (37)	5 (9)	230 (19)
SUL	≥512 ^b	121 (14)	75 (29)	4 (7)	200 (17)
TMP	≥16 ^b	42 (5)	40 (16)	2 (3)	84 (7)

STR, streptomycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; AMP, ampicillin; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline; SUL, sulfamethoxazole; TMP, trimethoprim.

^aRef. 20.

^bRef. 19.

^cRef. 5.

Table 3. Distribution of class 1 integrons among *Salmonella* isolates from different sources

Source (no. of isolates)	No. of sulphonamide-resistant isolates (%)	No. of isolates with class 1 integrons (%)
Humans (867)	121 (14)	93 (11)
Food products (258)	75 (29)	59 (23)
pork (85)	49 (58)	39 (46)
poultry (98)	10 (10)	9 (9)
beef (10)	8 (80)	6 (60)
other (27)	1 (4)	0 (0)
unknown (38)	7 (18)	5 (13)
Environment (58)	4 (7)	2 (3)
Total (1183)	200 (17)	154 (13)

Table 4. Distribution of class 1 integrons among *Salmonella* isolates of different serotypes

Serotype	No. of sulfonamide-resistant isolates	No. of isolates with class 1 integrons
Typhimurium	122	88
Enteritidis	23	19
Rissen	18	18
Derby	8	8
Saintpaul	4	4
Heidelberg	1	1
Bredeney	3	2
Brandenburg	4	4
Muenchen	4	4
Brikama	2	2
IIIb:65:lv:enxz15	1	1
ND	10	3
Total	200	154

ND, serotype not determined.

and environmental isolates tested, respectively (Table 3). Sulphonamide resistance and class 1 integrons were more frequently found among isolates from pork products (49/85 and 39/85, respectively) than among isolates from poultry products (10/98 and 9/98, respectively). Apart from other less frequent serotypes, *Salmonella* serotype Enteritidis, the predominant serotype in human infection, was rarely found among the sulphonamide-resistant isolates (23/200) and isolates carrying class 1 integrons (19/154). In contrast, the high prevalence of *Salmonella* Typhimurium among the isolates with sulphonamide resistance (122/200) and those carrying class 1 integrons (88/154) is remarkable (Table 4).

Taking into account the number and size of the amplicons associated with an isolate, the RFLP patterns and sequencing data, eight class 1 integron profiles (IPs) were defined: IP I included two integrons (1000 and 1200 bp) and IP II to IP VIII included one integron each of different size (1000–2000 bp), whose variable region carried one or two

resistance genes (Table 5). Eight different gene cassettes were detected, encoding resistance to aminoglycosides, trimethoprim and β -lactams. A single gene cassette was present in integrons from 65 isolates and two gene cassettes were identified in integrons from 85 isolates (Table 5). The aminoglycoside adenylyltransferase genes (*aadA*), which confer resistance to streptomycin and/or spectinomycin, were the most prevalent among gene cassettes. The *aadA* genes (*aadA1*, *aadA2* and *aadA5*), alone or in combination with other resistance genes, were observed in variable regions of all but one integron-containing isolate and were always located close to the 3'CS. As a common feature, 65 of those integrons included an *aadA* gene downstream of a trimethoprim resistance gene (*dfrA1*, *dfrA12* or *dfrA17*). An integron-associated β -lactamase gene was identified in 67 isolates, conferring resistance to ampicillin: *bla_{PSE-1}* in 47 integrons of 1200 bp and *bla_{OXA-30}* in 20 integrons of 2000 bp, upstream of the *aadA1* gene. Several integrons shared identical gene cassettes: IP I, IP II and IP VII, *aadA2*; IP III, IP V and IP VIII, *aadA1*; and IP I and IP IV, *bla_{PSE-1}*. As described previously,²⁸ the *sul1* gene was located in 149 of the class 1 integrons and the other *sul* genes (*sul2* or *sul3*) were found in five strains whose integrons lacked the *qacEΔ1* and *sul1* genes. In four isolates whose integrons lacked the *qacEΔ1* and *sul1* genes, the *sul3* gene conferred the sulphonamide resistance and the two gene cassettes typical of the IP VII (*dfrA12* and *aadA2*) were detected (Table 5).

Class 2 integrons

Resistance to trimethoprim was observed in 84 isolates, being associated with resistance to sulphonamides in 83 of those isolates. Five out of 200 (3%) sulfamethoxazole-resistant strains simultaneously presented class 1 and class 2 integrons. The RFLP profiles of variable regions (PCR product of ~2200 bp) of the five class 2 integrons were similar and sequencing of one of the PCR products revealed the presence of three resistance genes: *dfrA1*, *sat1* and *aadA1*. One of those isolates was from the Typhimurium serotype and four isolates presented a clonal relationship and were classified as serotype Muenchen, all isolated from humans.

Relationships of integrons, serotypes, origins and PFGE clones

Although the spread of the class 1 integrons occurred among several *Salmonella* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Rissen, Derby, Saintpaul, Brandenburg, Muenchen, Bredeney, Brikama, IIIb:65:lv:enxz15 and Heidelberg) a reduced number of PFGE clone types carrying class 1 integrons (20 clones/150 isolates) was observed (Table 5 and Figure 1). It is important to note that the integron-carrying *Salmonella* isolates were from diverse sources and regions. The presence of class 1 integrons was mainly associated with serotype Typhimurium (88/154) (Tables 4 and 5). Two 1000 bp (*aadA2*) and 1200 bp (*bla_{PSE-1}*) integrons were specific for the MDR DT104 serotype Typhimurium clone, and one of 2000 bp (*bla_{OXA-30}-aadA1*) was carried only by another serotype Typhimurium clone, previously published,²⁹ both obtained from geographically distant locations and sources, including animal food products and humans. In contrast, the other profiles appeared dispersed through several serotypes, with the integrons carrying *aadA* (*aadA1* or *aadA2*) downstream of the *dfrA* (*dfrA1* or *dfrA12*) as the most

Table 5. Integrons, antimicrobial resistance profiles and PFGE types of *Salmonella* serotypes isolates from humans, foods and the environment during 2002–2003

Class 1 integrons (gene cassettes)	Serotype (phage type) ^a	PFGE types ^b	Resistance phenotype ^{c,d}	Origin (no. of isolates) ^e	Transconjugants (no. positive/no. tested)
IP I: 1000 (<i>aadA2</i>) + 1200 (<i>pse-1</i>)	Typhimurium DT104	A	STR, AMP, CHL, TET, SUL (NAL)	S (7), C (3), H (36)	0/4
IP II: 1000 (<i>aadA2</i>)	Typhimurium DT104	A (1), A2 (2), A3 (1)	STR, SUL (AMP, CHL, TET, TMP)	H (4)	0/4
	Derby	B (1), B3 (7)	STR, SUL (TET)	S (5), C (2), U (1)	0/8
IP III: 1000 (<i>aadA1</i>)	Enteritidis	C	STR, AMP, NAL, SUL	H (1)	1/1
	Muenchen	D	STR, CHL, SUL, TMP	H (4)	4/4
	ND ^f	E	STR, NAL, TET, SUL	S (1)	1/1
IP IV: 1200 (<i>pse-1</i>)	Typhimurium DT104	A	AMP, SUL	H (1)	0/1
IP V: 1700 bp (<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>)	Heidelberg	F	AMP, TET, SUL, TMP	P (1)	1/1
	Enteritidis	C	SUL, TMP (STR, GEN, AMP, NAL, TET)	P (1), U (1), H (12)	14/14
	Enteritidis	K	TET, SUL	H (1)	1/1
	Brandenburg	G	AMP, CHL, TET, SUL, TMP (STR)	S (4)	0/4
	Saintpaul	H	STR, AMP, CHL, TET, SUL, TMP	P (2)	0/2
	Saintpaul	I	STR, AMP, CHL, TET, SUL, TMP	P (2)	0/2
	Typhimurium	J	STR, KAN, AMP, CHL, TET, SUL, TMP	S (1)	1/1
IP VI: 1800 (<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>)	Bredeney	L	TET, SUL, TMP	H (2)	0/2
IP VII: 2000 (<i>dfrA12</i> , <i>orfF</i> , <i>aadA2</i>)	ND ^f	M	STR, AMP, TET, SUL, TMP (CHL)	S (2)	0/2
	Rissen	N	STR, TET, SUL, TMP (AMP, CHL)	S (13), P (1), U (2), H (2) ^h	5/18
	Typhimurium DT104	O (1), O3 (10) ^g	STR, AMP, SUL, TMP (GEN, NAL, TET, CHL)	S (2), P (1), U (1), H (5), E (2)	0/11
	Enteritidis	P	STR, AMP, TET, SUL, TMP (KAN)	H (2)	0/2
	Typhimurium	Q	CHL, TET, SUL, TMP (STR)	H (2) ^h	0/2
	Brikama	R	STR, GEN, AMP, CHL, TET, SUL, TMP	H (2)	2/2
	IIIb:65:lv:enxz15	S	STR, CHL, SUL, TMP	H (1) ^h	1/1
IP VIII: 2000 (<i>oxa30</i> , <i>aadA1</i>)	Typhimurium	T (14), T1 (6)	STR, AMP, TET, SUL (GEN, NAL, CHL, TMP)	S (4), P (1), H (15)	19/20

^aA, PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 and U302 phage types was performed.¹²^bClones are designated by capital letters, and subtypes are defined by a subindex that indicates the number of bands that differ from the strain considered to be the initial PFGE type (three bands of difference at most).
^cUnderlining represents antibiotic resistance transferred to transconjugants.^dSTR, streptomycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; AMP, ampicillin; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline; SUL, sulfamethoxazole; TMP, trimethoprim.^eH, humans; S, pork products; P, poultry products; C, beef products; U, unknown food product; E, environment.^fND, serotype not determined.^gThe bands that differed from the strain considered to be the initial PFGE type were in different locations in the PFGE gel.^hClass 1 integrons lacking the *qacEΔ1* and *sul1* genes (four isolates).

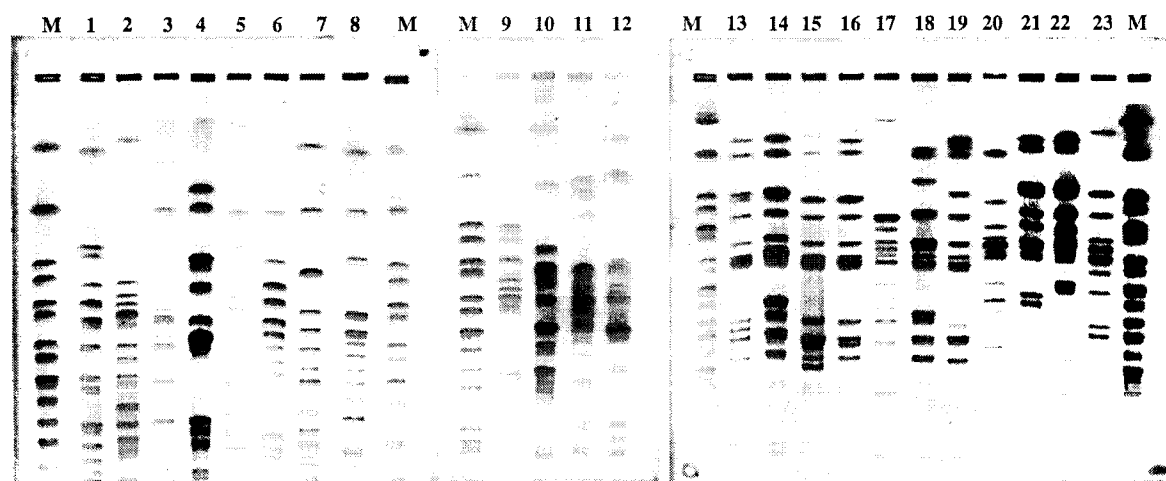


Figure 1. Representative PFGE patterns of *Salmonella* isolates with integrons. Lanes: M, *Salmonella* serotype Braenderup H9812 (CDC); 1, type D (IP III); 2, type E (IP III); 3, type C (IP V); 4, type K (IP V); 5, type M (IP VI); 6, type N (IP VII); 7, type S (IP VII); 8, type G (IP V); 9, type F (IP V); 10, type R (IP VII); 11, type P (IP VII); 12, type C (IP III); 13, type A (IP I); 14, subtype A3 (IP II); 15, type O (IP VII); 16, subtype O3 (IP VII); 17, type J (IP V); 18, type Q (IP VII); 19, subtype T1 (IP VIII); 20, type B (IP II); 21, type H (IP V); 22, type I (IP V); 23, type L (IP VI).

disseminated among different serotypes and sources, including humans, environment, pork and poultry products (Table 5). It is important to stress that all integron types were shared by isolates obtained either from humans or food products, geographically dispersed. The presence of class 1 integrons was more frequent among isolates from pork products (39/154) than from poultry (9/154) (Tables 3 and 5). In fact, all integron types, with the exception of IP IV, were observed in human and pork isolates, in contrast with a lower diversity in poultry (IP V, IP VII and IP VIII).

Conjugation assays

Out of 108 *Salmonella* isolates tested 50 transferred their plasmids containing integrons to *E. coli*; the resistance profiles acquired by the transconjugants are shown in Table 5. The conjugation results obtained with four isolates supported the chromosomal location of the class 1 integrons in the prevalent Typhimurium DT104 clone, as no transconjugants were obtained on the selection plates containing sulfamethoxazole. In contrast with the antimicrobial resistance determinants in *Salmonella* Typhimurium DT104, most of the integrons in other *Salmonella* isolates were encoded in a transferable plasmid and could be transferred to *E. coli* by conjugation.

Discussion

In the present study, the widespread occurrence of resistance to several groups of antibiotics in Portuguese *Salmonella* isolates was demonstrated, especially among those of food-borne origin. The most frequent resistance phenotypes observed were to tetracycline, streptomycin, ampicillin and sulphonamide. These findings may not be surprising, as these antimicrobials have been widely used in modern animal production systems, both in Portugal and other countries.^{11,25,30} As an interesting example, it seems important to consider the high prevalence of resistance to sulfamethoxazole, mainly associated with the serotype Typhimurium, which accounts for 29% of resistance when only food products are considered, as a possible reflection

of high usage of sulphonamides in food-producing animals, as verified in our country by Pena *et al.*³¹ In opposition with current reports on non-typhoid *Salmonella* strains isolated in various countries worldwide,^{3,4,17} the dissemination of ESBL-producing isolates has not yet been documented in Portugal, in spite of the high percentage of isolates exhibiting ampicillin resistance. Additional information also worthy of attention seems to be the high incidence of nalidixic acid-resistant isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolones, as observed in this study, due to the possibility of treatment failures in invasive gastrointestinal infections when these agents are used.⁵ This worrisome feature, observed in human and food-borne isolates, especially in poultry isolates, seems to be mainly associated with serotype Enteritidis (data not shown), an observation that is in close agreement with other European studies.³²

It has been argued that a substantial proportion of antimicrobial resistance to several antibiotics is the responsibility of integron structures.^{7,8} In the present study, the presence of gene cassettes coding for a particular antibiotic resistance was only demonstrated for streptomycin, trimethoprim, ampicillin and sulphonamides. In addition, the results of conjugation experiments also suggested the structural association of resistance genes in mobile elements, including those encoded by integrons, which might account for the increase in MDR *Salmonella*. Therefore, there seems to exist a strong association between multiresistance and the presence of integrons,^{8,26} a fact that can be easily confirmed when analysing the present results where a high (77%) proportion of sulphonamide-resistant (which are also MDR isolates) *Salmonella* isolates presented integrons.

The analysis of the cassette arrays revealed a predominance of cassettes that confer resistance to aminoglycosides (*aadA* genes) and trimethoprim (*dhfr* genes), with *aadA* genes carried by all the integron-containing *Salmonella* serotypes. The persistence of these genes, which have been reported worldwide in isolates of different origins,^{9-13,17} might be associated with the extensive use of streptomycin in food-producing animals, or is most likely the result of their structural association with other resistance genes (co-selection), such as the *sulI* gene, for which selective pressure is continuously observed or with genetic elements whose

extreme versatility promotes their conservation.³³ However, not all the Enteritidis serotype strains with the *dfrA1*-*aadA1* integron were resistant to streptomycin even though they harboured the *aadA1* gene, as also described by White *et al.*¹⁷ It is also interesting to note that five strains harboured two different integrons (class 1 and class 2) containing the *aadA1* gene cassette, as observed by other authors,²⁶ although the benefit of having these two identical genes has not yet been fully understood.

Most of the class 1 integrons, especially IP V (*dfrA1*, *aadA1*) and IP VII (*dfrA12*, *orfF* *aadA2*), were shared by several clones from the same or different serotype, which is suggestive of horizontal transfer, as confirmed by our conjugation results, and might indicate a wide dissemination of the specific structures in which integrons are located. All five class 2 integrons carried the same three cassettes as those found in Tn7, namely *dfrA1*, *sat1* and *aadA1*, which could be explained by the fact that class 2 integrons are unable to excise existing cassettes or insert new ones.²⁶ In contrast with class 1 integrons, this class of integrons was only detected in human isolates, one serotype Typhimurium isolate and in a clone of serotype Muenchen (this is the first report of a class 2 integron in the serotype *Salmonella* Muenchen), suggesting that class 2 integrons are less commonly found among *Salmonella* isolates from different origins. In addition, the low diversity among the integron gene cassettes in our sample suggests a great stability of several types of integron profiles, in agreement with other studies in different countries, indicating a wide distribution of some integrons in *Salmonella*.^{9-13,15-17}

The presence of class 1 integrons was more frequent in serotype Typhimurium, including the pentaresistant DT104 and other worrisome MDR clones carrying different integron structures, whose dissemination seems to be associated with the food chain. Also, our study highlights the presence of resistance genes associated with integrons in additional non-Typhimurium serotypes, such as Enteritidis, a predominant serotype generally associated with low rates of resistance,³² and in less-prevalent serotypes with possible extensive reservoirs.

Serotype-specific class 1 integrons were found, such as the 1000–1200 bp, known to be part of the chromosomal located *Salmonella* genomic island 1 (SGI1),³⁴ in the stable and widely disseminated clone of MDR serotype Typhimurium DT104,^{10,12,15,16,24} the predominant integron-carrying clone recovered in our study. In this study, apart from the presence of isolates of the widespread clone of serotype Typhimurium DT104 carrying only one of those gene cassettes (*aadA2* or *pse-1*), it is important to note that the *aadA2* gene cassette was also dispersed in another clone of a different serotype (Derby), suggesting the distribution of the SGI1 in *S. enterica* serotypes other than serotype Typhimurium DT104, as observed by Boyd *et al.*³⁴ The presence of the 2000 bp integron carrying *bla*_{OXA-30} and *aadA1* gene cassettes was specific for another MDR Typhimurium clone, disseminated in our country by food products of animal origin (pork products) and obtained from geographically dispersed sources and locations, as previously described.²⁹ In Portugal, the ongoing spread of this MDR clone and the possible transfer of the plasmid encoding this integron to other strains is a worrisome issue, as virulence and multidrug resistance could be genetically linked, as observed recently in plasmids carrying related integrons.^{35,36}

Although a large collection of MDR *Salmonella* isolates obtained from geographically dispersed regions in Portugal and

from human and non-human samples was studied, only 20 PFGE types of at least 11 serotypes revealed class 1 integrons. The observation of those particular PFGE types might reflect an improved fitness of specific clones able to survive under harmful conditions, as antibiotic selective pressure or other compounds used in the veterinary field. On the other hand, the finding that no difference was observed in the distribution of integron types between human and food isolates suggests human acquisition through the food chain from several reservoirs of animal origin. However, differences in prevalence and gene cassette arrays of class 1 integrons were found in *Salmonella* isolates according to the food-animal sources, as also observed by other authors in *E. coli* isolates.³⁷ In contrast with the higher prevalence and diversity of integron types in pork products, the lower prevalence and diversity of integron types in poultry products and the reduced number of clones within this niche may be related to the characteristics of this current animal production, where only a few different genetic lines of primary breeding flocks are used, limiting host diversity. The differences in the antibiotic selective pressure imposed through several years of intensive use might have enhanced the spread of specific clones and integrons perfectly adapted to a certain host type, within different sources.

Our data suggest that food-producing animals might be simultaneously considered as a reservoir of clones and integrons carrying antibiotic resistance genes, thus making the food chain, especially pork products, a possible source of MDR isolates in humans. Intensive antibiotic use over several years may have contributed to the selection of particular clones, integrons and integron-carrying genetic elements, although other factors, not directly related to resistance, may contribute to their spread and niche specificity. Surveillance of the integron content in *Salmonella* populations of different sources (clinical, food and environmental samples) can provide powerful information concerning the evolutionary changes of gene cassettes, which may be fundamental to estimate health risk and to prevent the spread of particular antibiotic resistance determinants via the food chain from animals to humans.

Acknowledgements

We are very grateful to Centro Nacional de *Salmonella* (Lisboa, Portugal) for the serotyping of the strains and to CDC for the PFGE protocols and the control strain *Salmonella braenderup* H9812. This study was partially supported by Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal (project no. 49975).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the Monitoring of Zoonoses and Zoonotic Agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Official Journal L 325, 2003, pp. 0031–0040.
2. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002; **26**: 141–8.
3. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ *et al.* Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; **23**: 547–55.

4. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **43**: 1–11.
5. Aarestrup FM, Molbak K, Threlfall EJ. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 827–9.
6. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1998; **1**: 109–19.
7. Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 2002; **292**: 115–25.
8. Leverstein-van Hall MA, Blok HEM, Donders ART *et al.* Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 2003; **187**: 251–9.
9. Ahmed AM, Nakano H, Shimamoto T. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 371–4.
10. Ebner P, Garner K, Mathew A. Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SG11 in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 1004–9.
11. Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR *et al.* Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997–2000. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 997–1003.
12. Guerra B, Soto S, Cal S *et al.* Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2166–9.
13. Lindstedt B-A, Heir E, Nygard I *et al.* Characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 141–9.
14. Nastasi A, Mammina C. Presence of class 1 integrons in multidrug-resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 455–8.
15. Nógrády N, Gadó I, Tóth A *et al.* Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**: 126–32.
16. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK *et al.* Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 208–16.
17. White DG, Zhao S, Sudler R *et al.* The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med* 2001; **345**: 1147–54.
18. Pritchett LC, Konkel ME, Gay JM *et al.* Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3484–88.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
20. DANMAP 2004. *Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark*, July 2005. ISSN 1600–2032. Statens Serum Institut, Danish Veterinary and Food Administration, Danish Medicines Agency, and Danish Institute for Food and Veterinary Research.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement M100-S12*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
22. Lévesque C, Piché L, Larose C *et al.* PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 185–91.
23. Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Moller N *et al.* Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulfonamide resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 513–6.
24. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **160**: 37–41.
25. Mazel D, Dychinco B, Webb VA *et al.* Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1568–74.
26. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2658–61.
27. Centers for Disease Control and Prevention. *One-Day (24–48 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, Non-typhoidal Salmonella Serotypes, and Shigella sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. Atlanta, Georgia, USA: PulseNet PFGE Manual, CDC, 2002.
28. Antunes P, Machado J, Sousa JC *et al.* Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 836–9.
29. Antunes P, Machado J, Sousa JC *et al.* Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 429–34.
30. European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA). *Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products*, 1999. EMEA/CVMP/342/99-corr-Final. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/regaffair/034299en.pdf> (August 2005, date last accessed).
31. Pena A, Serrano C, Réu C *et al.* Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Addit Contam* 2004; **21**: 749–55.
32. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C *et al.* Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003; **8**: 41–5.
33. Chiew Y-F, Yeo S-F, Hall LMC *et al.* Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 1998; **41**: 247–51.
34. Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E *et al.* Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1714–22.
35. Guerra B, Soto S, Helmuth R *et al.* Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2977–81.
36. Villa L, Carattoli A. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1194–7.
37. Box ATA, Mevius DJ, Schellen P *et al.* Integrons in *Escherichia coli* from food-producing animals in The Netherlands. *Microb Drug Resist* 2005; **11**: 53–7.
38. Lee JC, Oh JY, Cho JW *et al.* The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 599–604.
39. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 11–8.

2.5. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, João Carlos Sousa², Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

***Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54:429-434**

Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, João Carlos Sousa² and Luísa Peixe^{2*}

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto; ²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, no. 164, 4050-047 Porto; ³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Received 3 February 2004; returned 5 April 2004; revised 14 May 2004; accepted 19 May 2004

Objectives: Characterization of the molecular basis for β -lactam resistance and evaluation of the clonal relatedness among nine isolates of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* recovered from seven clinical human samples and two pork end products.

Methods: The isolates were examined for susceptibility to antimicrobial agents. The relationships between resistance genes, class 1 integrons, plasmids and isolates were screened by molecular methods such as polymerase chain reaction and restriction fragment length analysis.

Results: A *bla*_{OXA-30} gene, located in a class 1 integron, was detected in all isolates. This integron was present on a conjugative plasmid in all but one isolate. By pulsed-field gel electrophoresis, it was determined that all strains share the same chromosomal type.

Conclusions: This study demonstrates the spread of an OXA-30-producing *S. typhimurium* in Portugal, suggesting dissemination of a resistant clone through the food chain.

Keywords: salmonellosis, food-borne diseases, class 1 integrons, antimicrobial resistance, β -lactams

Introduction

β -Lactam antibiotics are widely used in the treatment of salmonellosis in humans, particularly in children and neonates, as well as in food animals. It is accepted that the use of antimicrobials in food animals has been a major factor in the emergence and dissemination of *Salmonella* with decreased susceptibility to antibiotics, including β -lactams.¹ Resistance to broad-spectrum cephalosporins is widespread among strains of *Salmonella* with increasing reports of isolates that produce either an extended-spectrum β -lactamase (ESBL), such as TEM- and SHV-type, CTX-M-type, or plasmid-mediated AmpC-type enzymes.² Recently, an OXA-30 β -lactamase produced by *Salmonella typhimurium* has been described.³ Resistance to multiple classes of antibacterial agents among *Salmonella* is increasingly associated with the presence of class 1 integrons carrying multiple resistance genes. *bla*_{PSE-1},^{4,5} *bla*_{CTX-M-2}⁶ and *bla*_{OXA-1}^{5,7} have previously been shown to be carried on integrons in this genus.

During an antibiotic resistance survey of *Salmonella* isolates from human and food samples in Portugal in 2002/2003,

we detected nine isolates with reduced susceptibility to co-amoxiclav and synergy of clavulanic acid with cefotaxime and cefepime. In this study, we have characterized the molecular basis of β -lactam resistance in these isolates, and have determined the relationship between the isolates, and the resistance genes, class 1 integrons and plasmids carried by them.

Materials and methods

Bacterial strains

Seven human *S. typhimurium* isolates from unrelated clinical cases (one outbreak and six sporadic cases) were obtained from stools in four geographically distant hospital units in Portugal between September 2002 and May 2003. Five isolates were recovered from children with typical gastroenteritis, without any history of antimicrobial therapy. *Salmonella* 172/03 was isolated from a 3-year-old child with gastroenteritis following co-amoxiclav treatment for recurrent otitis. The remaining isolate, *Salmonella* BIO104H, was isolated from a 1.5-month-old infant, fed with mother's breast milk, that presented inflammation of the mammary gland on admission to

*Corresponding author. Tel: +351-22-2078972; Fax: +351-22-2003977; E-mail: lpeixe@ff.up.pt

Table 1. Epidemiological information for the *S. typhimurium* isolates used in this study

Isolate	Month/year of isolation	Source	Geographic location (hospital unit)	Outbreak or sporadic case	Patient data—gender/age
BIO67H	Sept 2002	clinical sample (stool)	St Maria da Feira, north-west region (Hospital 1)	sporadic	M/2 years
LP-2	Oct 2002	pork sausage (retail product)	north-west region	—	—
C-11	Dec 2002	pork product (retail product)	south-east region	—	—
172/03	Apr 2003	clinical sample (stool)	Vila Real, north-east region (Hospital 2)	sporadic	M/3 years
237/03	Apr 2003	clinical sample (stool)	Vila Real, north-east region (Hospital 2)	sporadic	F/4 years
BIO104H	May 2003	clinical sample (stool)	St Maria da Feira, north-west region (Hospital 1)	sporadic	F/1.5 months
236/03	May 2003	clinical sample (stool)	St Tirso, north-west region (Hospital 3)	outbreak	M/9 years
367/03	June 2003	clinical sample (stool)	Amadora, south-west region, (Hospital 4)	sporadic	F/7 months
368/03	June 2003	clinical sample (stool)	Amadora, south-west region (Hospital 4)	sporadic	F/7 years

the hospital. Although the patient's clinical condition improved, after flucloxacillin administration, the clinical course was complicated, on day 5, by severe gastroenteritis (bloody and mucous diarrhoea). During the same period, two *S. typhimurium* isolates were recovered from pork end products: one from a pork sausage collected in the north of Portugal and one from a food mainly consisting of fried bacon and pork grease, collected in the southern countryside (Table 1).

The biochemical profile of *Salmonella* was confirmed using the API 32GN system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The serotype of each isolate was determined at the National Centre of *Salmonella* (Instituto Nacional de Saúde, Lisboa, Portugal). A PCR assay for identification of *S. typhimurium* DT104 and U302 phage types was conducted according to Pritchett *et al.*⁸

Antimicrobial susceptibility testing and investigation of β -lactamase expression

The MICs of 10 antimicrobial agents (streptomycin, kanamycin, gentamicin, ampicillin, nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline, sulfamethoxazole and trimethoprim) were determined by the agar dilution method.⁹ Susceptibility to β -lactam agents was assessed both by the disc diffusion¹⁰ and Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) methods. A double-disc synergy test for the detection of ESBL production was carried out using a co-amoxiclav disc placed next to ceftazidime, cefotaxime, cefuroxime, aztreonam, ceftriaxone and cefepime discs on Mueller–Hinton agar 2 (bioMérieux).

The pIs of the β -lactamases expressed by the isolates were determined by isoelectric focusing in a PhastSystem (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) with ampholine gels of pH 3–9 (Phast gels, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). β -Lactamase bands were visualized with nitrocefin (100 μ M) (Oxoid, Basingstoke, UK). Detection of β -lactamase genes by PCR was carried out using primers designed for the detection of genes encoding OXA group III¹¹ and TEM-type¹² enzymes.

Conjugation and plasmid analysis

Conjugative transfer of plasmids from *S. typhimurium* isolates into *Escherichia coli* K802N (*hsdR*, *hsdM*, *gal*, *met*, *supE*, *gyrA*) or *E. coli* K802N (Rif^R) was attempted using agar plates. Transconjugants were selected on Mueller–Hinton agar 2 (bioMérieux) containing ampicillin (64 mg/L) plus nalidixic acid (64 mg/L) (or 100 mg/L rifampicin if the donor was nalidixic acid-resistant) and sulfamethoxazole (256 mg/L) plus nalidixic acid (64 mg/L) or rifampicin (100 mg/L). Plasmids harboured by *S. typhimurium* isolates

and *E. coli* transconjugants were extracted using a rapid methodology (QIAGEN Plasmid Midi Kit; Qiagen, Hilden, Germany). The sizes and relatedness of plasmids harboured by the transconjugants were estimated by single restriction analysis using *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*.

Detection and characterization of class 1 integrons

The presence of class 1 integrons in the isolates was confirmed by PCR using the primers 5'CS-3'CS.¹³ To determine the content of the variable regions of the integrons, the 5'CS primer was used in combination with a reverse primer for the streptomycin resistance gene [*ant(3')*-Ia]⁴ and a reverse primer for OXA group III.¹¹ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using *TaqI* was also carried out on all class 1 integron PCR amplicons. To confirm the association of integrons with conjugative plasmids, PCRs using the 5'CS and reverse OXA group III primers were also carried out using plasmids extracted from transconjugants as the template. The presence of *sulI* and *qacEΔ1* genes was confirmed by PCR, using specific primers.⁴

PCR amplicons obtained with 5'CS and 3'CS primers from four isolates (two from humans and two from food products) were purified and sequenced by the dideoxy-chain termination method with an ALF Express automatic DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), using the primers 5'CS and 3'CS, and the internal primer (5'-GGATTAACAGAAGCATGGCT-3').

Pulsed-field gel electrophoresis

Clonality amongst the isolates was assessed by PFGE following *XbaI* digestion of genomic DNA according to the standard 1-day protocol of the CDC. Genomic DNA from *Salmonella braenderup* H9812 obtained from the CDC was also restricted with *XbaI* and used as a size standard. Isolates with electrophoretic patterns that differed by less than three bands, at most, were assigned to the same type.

Results

Resistance to amoxicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole and tetracycline (ACSSuT) was observed in eight of the *S. typhimurium* isolates, with the other (isolate 172/03) lacking chloramphenicol resistance. Additionally, resistance to nalidixic acid was observed in isolate 368/03, and resistance to trimethoprim plus gentamicin in isolate 236/03 (Table 2). Although the ACSSuT resistance profile is usually associated with *S. typhimurium* DT104,^{4,5} none of the isolates in this study

Table 2. Antimicrobial susceptibility profiles of *S. typhimurium* isolates and transconjugants

Isolates ^a	MIC (mg/L)														Resistance to other antibiotics ^b		
	AMX	AMC	PIP	TZP	TIC	TIM	CEF	FOX	CTX	CAZ	FEP	CR	IPM	MEM	ERT	ATM	
BIO67H	>256	8	64	8	>256	32	2	2	0.125	0.25	0.5	0.5	0.25	0.016	0.004	0.064	ACSSuIT
BIO67H/T	>256	16	64	16	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	2	0.5	0.032	0.008	0.125	ASSuI NA
LP-2	>256	8	64	16	>256	32	4	4	0.25	0.25	0.5	1	0.25	0.016	0.008	0.064	ACSSuIT
LP-2/T	>256	16	128	16	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	1	0.5	0.032	0.016	0.125	ACSSuIT NA
C-11	>256	8	64	16	>256	32	4	2	0.25	0.25	0.5	1	0.25	0.016	0.008	0.064	ACSSuIT
C-11/T	>256	16	128	16	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	1	0.5	0.032	0.016	0.125	ACSSuIT NA
172/03	>256	8	>256	64	>256	64	4	2	0.5	0.25	2	2	0.25	0.032	0.012	0.064	ASSuIT
172/T	>256	16	>256	32	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	1	0.5	0.064	0.016	0.125	ASSuIT NA
237/03	>256	16	>256	32	>256	64	4	2	0.5	0.25	1	2	0.25	0.032	0.008	0.064	ACSSuIT
237/T	>256	16	>256	32	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	1	0.5	0.064	0.008	0.064	ACSSuIT NA
BIO104H	>256	8	64	16	>256	32	4	2	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.016	0.008	0.064	ACSSuIT
BIO104H/T	>256	16	128	32	>256	64	8	4	0.25	0.5	1	1	0.5	0.032	0.008	0.125	ACSSuIT NA
236/03	>256	8	>256	16	>256	64	8	2	0.125	0.25	0.5	1	0.5	0.016	0.004	0.064	ACSSuIT TRI G
367/03	>256	8	>256	32	>256	64	4	2	0.25	0.25	1	2	0.25	0.032	0.008	0.125	ACSSuIT
367/T	>256	16	>256	64	>256	64	8	4	0.5	0.25	1	2	0.5	0.016	0.008	0.125	ACSSuIT NA
368/03	>256	16	>256	32	>256	64	4	2	0.5	0.25	1	2	0.5	0.016	0.008	0.064	ACSSuIT NA
368/T	>256	16	>256	32	>256	64	4	4	0.5	0.25	1	1	0.5	0.032	0.008	0.125	ACSSuIT NA RIF
<i>E. coli</i> K802N	4	4	1	1	6	4	4	2	0.064	0.25	0.064	0.064	0.5	0.032	0.008	0.125	NA

AMX, amoxicillin; AMC, co-amoxiclav; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; TIC, ticarcillin; TIM, ticarcillin-clavulanic acid; CEF, cefalothin; FOX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CR, ceftiprone; IPM, imipenem; MEM, meropenem; ERT, ertapenem; ATM, aztreonam.

^aT, transconjugant.

^bA, amoxicillin; C, chloramphenicol; S, streptomycin; Sul, sulfamethoxazole; T, tetracycline; NA, nalidixic acid; G, gentamicin; TRI, trimethoprim; RIF, rifampicin.

was from the DT104 or U302 phage types according to the multiplex PCR test used as described by Pritchett *et al.*⁸

The MICs of β -lactams revealed resistance to aminopenicillins and carboxypenicillins, with activity of these agents being restored by clavulanic acid (Table 2). Although the isolates were susceptible to cephalosporins, a decreased activity of cefotaxime, cefepime and ceftiofur was observed. A double-disc test revealed synergy between co-amoxiclav and cefepime, cefotaxime and ceftiofur. The clavulanic acid effect was more pronounced with cefepime in all of the isolates. Using isoelectric focusing, eight of the isolates were shown to express a single β -lactamase with a pI value of 7.3. The ninth isolate, 236/03, expresses two detectable β -lactamases, one with a pI of 7.3, and one with a pI of 5.4.

PCR using various primer combinations to enable amplification of class 1 integron variable regions showed that in each isolate, a gene encoding a β -lactamase of the OXA group III, which includes OXA-1, OXA-4, OXA-30 and OXA-31,¹¹ and the *ant(3')-Ia* gene were carried in a class 1 integron of about 2000 bp. All of the integrons yielded the same *TaqI* RFLP profile (data not shown) and *sulI* and *qacEΔ1* genes in the conserved segment 3'CS. The sequence of each amplicon revealed two gene cassettes, with *bla*_{OXA-30} being 5' proximal to *aadA1* (GenBank accession no. AY534545).

The integron carrying *bla*_{OXA-30} was associated with a conjugative plasmid (>70 kb) in eight of the *S. typhimurium* isolates

(Figure 1) which were able to transfer *bla*_{OXA-30} to *E. coli* K802N. The ninth isolate, 236/03, which expresses two β -lactamases, was only able to transfer the pI 5.4 β -lactamase gene. PCR analysis revealed that this gene is from the *bla*_{TEM} group. Six of the conjugative plasmids carrying *bla*_{OXA-30} confer the ACSSuT resistance profile on the *E. coli* recipient, and restriction digests for these six plasmids were identical. In two isolates, BIO67H and 172/03, amoxicillin, streptomycin and sulfamethoxazole resistance, as well as tetracycline resistance in 172/03, was encoded on the conjugative plasmids, which were different from each other, and from the plasmid carrying the ACSSuT resistance profile according to RFLP analysis (Table 2 and Figure 1).

PFGE showed that all of the OXA-30-producing *S. typhimurium* isolates are highly related. The PFGE profiles of human isolates differ from the food-borne isolates by less than three bands, suggesting clonality (Figure 2).

Discussion

In Portugal, ~68 000 kg of antibiotics were used in animals in 1997,¹⁴ and mostly in pigs. Overall, the antimicrobials most frequently used in pigs are β -lactams, tetracyclines and sulfamethazine. It is commonly accepted that the use of antimicrobials in food animals has been a major contributor in

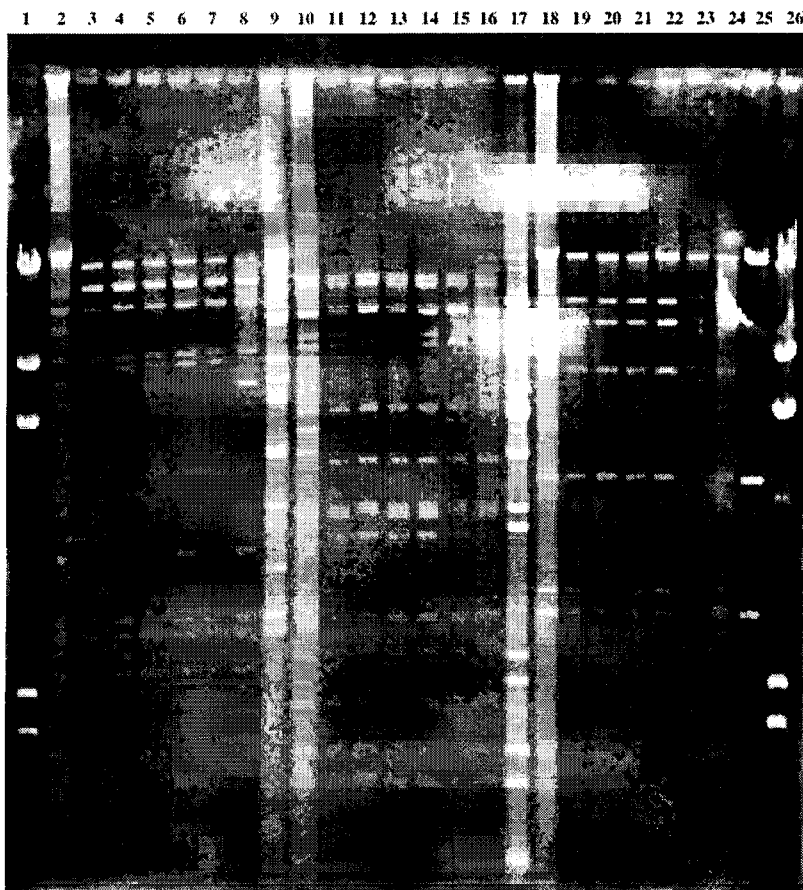


Figure 1. Restriction patterns of DNA plasmids isolated from *E. coli* transconjugants. Lanes: 1 and 26, λ HindIII molecular marker; 2 to 9, plasmids digested with HindIII; 10 to 17, plasmids digested with EcoRI; 18 to 25, plasmids digested with BamHI. Isolate: 172/T, lanes 2, 10 and 18; 237/T, lanes 3, 11 and 19; 367/T, lanes 4, 12 and 20; 368/T, lanes 5, 13 and 21; C-11/T, lanes 6, 14 and 22; BIO104H/T, lanes 7, 15 and 23; LP-2/T, lanes 8, 16 and 24; BIO67H/T, lanes 9, 17 and 25.

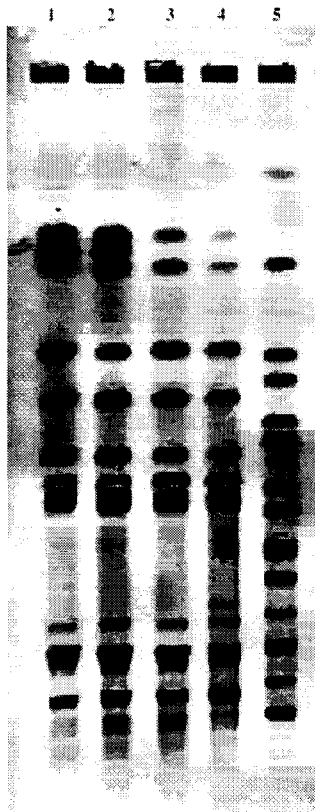


Figure 2. PFGE patterns of four *Salmonella typhimurium* isolates. Lanes: 1, LP-2; 2, C-11; 3, BIO67H; 4, BIO104H; 5, *Salmonella braenderup* H9812 (CDC).

the emergence and dissemination of *Salmonella* with decreased susceptibility to antibiotics, including β -lactams.¹

There have only been a few reports of OXA-30 β -lactamase-producing strains of *Shigella flexneri*,¹⁵ *E. coli*^{16–18} and *S. typhimurium*² and all are from human sources. The association of *bla*_{OXA-30} with class 1 integrons has recently been described in *S. typhimurium*¹⁹ and *E. coli*¹⁸ from human patients. The data presented here confirm that class 1 integrons carrying *bla*_{OXA-30} can be found in *S. typhimurium* isolates from products having animal origins. All the evidence presented suggests that the dissemination of OXA-30-producing *S. typhimurium* isolates throughout Portugal could be explained by the clonal spread of a particular strain. As the majority of *Salmonella* infections result in asymptomatic or self-limited diarrhoeal illness, it is probable that the real number of cases associated with this clone has been underestimated. Based on all available information, it is most likely that the OXA-30-producing *S. typhimurium* strain has been transmitted from food animals to humans. The fact that the two pork products were produced in geographically distinct regions minimizes the likelihood of independent contamination of these products by humans during processing.

It is tempting to speculate that acquisition of *bla*_{OXA-30} may relate to therapeutic use of β -lactams in pig production. However, persistence of multidrug-resistant strains of *Salmonella* in farm animals may be further encouraged by the use of other antimicrobials, a common practice in the veterinary field. Our results indicate the potential human health hazard of multiresistant *S. typhimurium* isolated from food and corroborate the increasing levels of antibiotic resistance in this microorganism. In addition,

*bla*_{OXA-30} was shown to be transferable through conjugation. Under such circumstances, further spread of *bla*_{OXA-30} is likely to occur. Also of special concern is the high level of resistance to extended-spectrum cephalosporins due to the high level of expression of OXA-30, as described by Oliver *et al.*¹⁶ The establishment and dissemination of a *S. typhimurium* clone that is different from the widespread multidrug-resistant clone of *S. typhimurium* DT104, with decreased susceptibility to therapeutically important broad-spectrum β -lactams, is a cause for concern.

Acknowledgements

We are very grateful to Rafael Cantón (Hospital Ramon et Cajal, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript, to Luís Marinho (Hospital S. Sebastião, Santa Maria da Feira, Portugal), Pedro Vale (Hospital de S. Tirso, Santo Tirso, Portugal), Ana Paula Castro (Hospital Distrital de Vila Real, Vila Real, Portugal) and Teresa Sardinha (Hospital Amadora-Sintra, Lisboa, Portugal) for providing the clinical data used in this study, to Centro Nacional de *Salmonella* (Lisboa, Portugal) for the serotyping of the strains and to CDC for the PFGE protocols and the control strain *Salmonella braenderup* H9812. This study was partially supported by Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal (project no. 49975).

References

1. Fey, P. D., Safraneck, T. J., Rupp, M. E. *et al.* (2000). Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine* **342**, 1242–9.
2. Shannon, K. & French, G. (1998). Multiple-antibiotic-resistant *Salmonella*. *Lancet* **352**, 490.
3. Hanson, N. D., Moland, E. S., Hossain, A. *et al.* (2002). Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 1011–4.
4. Sandvang, D., Aarestrup, F. M. & Jensen, L. B. (1998). Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 37–41.
5. Guerra, B., Soto, S., Cal, S. *et al.* (2000). Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2166–9.
6. Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P. *et al.* (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2257–61.
7. Lee, K., Yong, D., Yum, J. H. *et al.* (2003). Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 493–6.
8. Pritchett, L. C., Konkell, M. E., Gay, J. M. *et al.* (2000). Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3484–8.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement M100-S12*. NCCLS, Wayne, PA, USA.

11. Bert, F., Branger, C. & Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**, 11–8.
12. Peixe, L. V., Sousa, J. C. F., Perez-Diaz, J. C. *et al.* (1997). A *bla*_{TEM-1b}-derived TEM-6 β -lactamase: a case of convergent evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 1206.
13. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. *et al.* (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 185–91.
14. The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA). (1999). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. EMA/CVMP/342/99-corr-Final. [Online.] <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/regaffair/034299en.pdf> (February 2004, date last accessed).
15. Siu, L. K., Lo, J. Y. C., Yuen, K. Y. *et al.* (2000). β -Lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like β -lactamase, OXA-30. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2034–8.
16. Oliver, A., Weigel, L. M., Rasheed, J. K. *et al.* (2002). Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3829–36.
17. Miró, E., Navarro, F., Mirelis, B. *et al.* (2002). Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3991–4.
18. Dubois, V., Arpin, C., Quentin, C. *et al.* (2003). Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid- and integron-encoded OXA-30 β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 2380–1.
19. Gallardo, F., Ruiz, J., Soto, S. M. *et al.* (2003). Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Revista Española de Quimioterapia* **16**, 398–402.

2.6. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates

Patrícia Antunes^{1,2}, Jorge Machado³, Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal;

²REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal;

³Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

***Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2007; 51:1545-1548**

Dissemination of *sul3*-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an Unusual 3' Conserved Sequence Region among *Salmonella* Isolates[∇]

Patrícia Antunes,^{1,2} Jorge Machado,³ and Luísa Peixe^{2*}

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal¹; REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal²; and Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal³

Received 11 October 2006/Returned for modification 26 December 2006/Accepted 27 January 2007

A *sul3* domain (IS440-*sul3*-orf1-IS26) was found linked to an unusual 3' conserved sequence region (*qacH*) of class 1 integrons and detected among nontyphoid *Salmonella* isolates ($n = 47$) from different sources. Three types of integrons differing in the gene cassette array (*dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1*, *dfrA12-orfF-aadA2/1*, and *estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1*) were found associated with this *sul3* domain. They were associated with particular clones and specific high-molecular-weight plasmids.

Antimicrobial agents of the sulfonamide group have been widely used in the treatment of human infections and also administered to food animals (14, 17), a practice which has been argued to contribute to the maintenance or emergence of resistance (4). Sulfonamide resistance in gram-negative bacilli generally arises from the acquisition of one of the three genes, *sul1*, *sul2*, and *sul3*, encoding forms of dihydropteroate synthase that are not inhibited by the drug (14, 17). The *sul3* gene is the most recently described gene conferring resistance to sulfonamides (14) and has been increasingly identified in humans and principally among food animal isolates in the family *Enterobacteriaceae*. Several studies have demonstrated the dissemination of the *sul3* gene among *Escherichia coli* isolates from different origins and countries (5, 6, 7, 10, 14) and among *Salmonella* isolates from different sources and of different serotypes and clones (1, 8). The association of the genetic determinants for sulfonamide resistance with horizontally transferable capture genetic units may facilitate their dissemination. The spread of the *sul1* gene seems to be related to class 1 integrons, and the *sul2* gene is incorporated in plasmids (17). The dissemination and genetic background of the *sul3* gene have not been completely characterized. The *sul3* gene found in a Swiss *E. coli* isolate was flanked by transposable elements (*sul3* domain) inserted into a conjugative plasmid (14). Other studies have reported that *sul3* could be found on different large plasmids (6, 8). Only one recent report described the linkage of *sul3* to other resistance gene cassettes as part of an integron in swine *E. coli* isolates from the United States (5). Also in a previous study, we observed that all of the *Salmonella* isolates carrying the *sul3* gene contained a class 1 integrase, and in several of these isolates, *sul3* was the only sulfonamide resistance gene detected (1). The objective of this study was to characterize the genetic background of the *sul3* gene, including

its association with integron structures, in nontyphoid *Salmonella* isolates in order to understand the dissemination of this sulfonamide resistance gene.

This study included 45 *sul3*-carrying *Salmonella* isolates from different sources (humans, food products, and the environment) and of different serotypes detected among the sulfonamide-resistant isolates ($n = 331$) of a collection of 1,511 Portuguese nontyphoid *Salmonella* isolates recovered between 2002 and 2004. These 331 isolates were recovered from human clinical sources ($n = 204$), food products ($n = 114$), the environment ($n = 7$), and unknown sources ($n = 6$). Two isolates previously collected in a central hospital in 2000 were also included in the present study. Characterization of the sulfonamide-resistant isolates was performed as previously described (1, 2). The characteristics of the *sul3*-producing *Salmonella* isolates are presented in the Table 1. Sixteen of the *sul3*-positive isolates were from food products, principally pork products ($n = 10$), collected from distinct locations in Portugal. The 27 human *Salmonella* isolates were recovered from diverse sources (predominantly feces) and 14 hospitals in geographically dispersed regions. Three isolates were obtained from environmental sources (bathing water). The isolates carrying *sul3* belonged to four serotypes and eight PFGE clones, with most of them identified as *S. enterica* serotype Typhimurium (five clones) and *S. enterica* serotype Rissen (one clone). It is of note that isolates from two clones of *S. enterica* serotype Typhimurium were the predominant ones carrying the *sul3* gene. All of the *sul3*-positive isolates showed resistance to several antimicrobials; coresistance to streptomycin (*aadA*), chloramphenicol (*cmlA*, *catA*), tetracycline (*tetA* *tetB*), and trimethoprim (*dfrA12*) (Table 1) was observed in 60% of the isolates. The *cmlA* gene was observed in all of the chloramphenicol-resistant isolates and in one of them with *catA*.

Structure of the *sul3*-associated integrons. Several methodologies were used to determine the structure of the *sul3*-genetic elements: (i) PCR was used to screen isolates for the *sul3* gene, with plasmid pVP440 (14) used as a positive control. (ii) PCR amplification was then used to determine the organizational structure of *sul3*-associated integrons as described pre-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, no. 164, 4050-047 Porto, Portugal. Phone: 351 22 2078972. Fax: 351 22 2003977. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

[∇] Published ahead of print on 5 February 2007.

TABLE 1. Characteristics of the *sul3*-producing *Salmonella* isolates used in this study

Integron type, serotype (no. of isolates)	PFGE ^b	Source ^c (no. of isolates)	Isolation: yr/location (no. of isolates)	Resistance phenotype ^d and gene profile	Integron size (bp) and/or gene cassette (5'CS-3'CS) ^f	Size(s) (kb) ^f of plasmid(s) carrying <i>sul3</i> - associated integrons (no. of isolates)
I						
Rissen (2)	N	S (1), U (1)	2002 (1), 2004 (1)/north (1), south (1)	<u>Str^r Chl^r Tet^r Sul^r Tmp^r</u> <u><i>aadA2-aadA1 cmlA1</i></u> <u><i>tetA sul3 dfrA12</i></u>	<u><i>int1</i></u>	100 (2)
Typhimurium (7)	Q	H (6), S (1)	2000 (1), 2003 (2), 2004 (4)/north (7)	<u>Chl^r Sul^r Tmp^r (Str^r)</u> <u>Kan^r Tet^r cmlA1 sul3</u> <u><i>dfrA12 (aadA2-aadA1</i></u> <u><i>aphA1 tetB</i></u>	<u><i>int1</i></u>	100 (1), 160 (1), 165 (1)
IIIb:65:lv:enxz15 (1)	S	H (1)	2003 (1)/south (1)	<u>Str^r Chl^r Sul^r Tmp^r</u> <u><i>aadA2-aadA1 cmlA1</i></u> <u><i>sul3 dfrA12</i></u>	<u><i>int1</i></u>	100 (1)
Haifa (1)	Z	H (1)	2004 (1)/north (1)	<u>Str^r Amp^r Chl^r Tet^r Sul^r</u> <u>Tmp^r <i>aadA2-aadA1</i></u> <u><i>bla</i>_{TEM} <i>cmlA1 tetA</i></u> <u><i>sul2-sul3 dfrA12</i></u>	<u><i>int1</i></u>	165 (1)
Typhimurium DT104 (1) ^a	A	U (1)	2004 (1)/north (1)	<u>Str^r Amp^r Chl^r Tet^r Sul^r</u> <u>Tmp^r <i>aadA2-aadA1</i></u> <u><i>bla</i>_{TEM} <i>cmlA1 tetA</i></u> <u><i>sul1 sul3 dfrA12</i></u>	1,000; <i>aadA2</i>	135 (1)
II						
Rissen (3)	N	S (3)	2002 (2), 2003 (1)/ north (3)	<u>Str^r Amp^r Tet^r Sul^r</u> <u>Tmp^r <i>aadA2-aadA2/1</i></u> <u><i>bla</i>_{TEM} <i>tetA sul1-sul3</i></u> <u><i>dfrA12</i></u>	2,000; <i>dfrA12</i> <u><i>orfF aadA2</i></u>	70 (2)
III						
Typhimurium (1)	J	S (1)	2003 (1)/south (1)	<u>Str^r Kan^r Amp^r Chl^r</u> <u>Tet^r Sul^r Tmp^r</u> <u><i>aadA2-aadA1 aphA1</i></u> <u><i>bla</i>_{TEM} <i>cmlA1-catA</i></u> <u><i>tetB sul1-sul3 dfrA1</i></u>	1,700; <i>dfrA1</i> <u><i>aadA1</i></u>	240 (1)
Typhimurium DT104 (2) ^a	X	H (2)	2004 (2)/south (2)	<u>Str^r Gen^r Amp^r Chl^r</u> <u>Tet^r Sul^r Tmp^r</u> <u><i>aadA2-aadA1 aac(3)-</i></u> <u><i>IV bla</i>_{TEM} <i>cmlA1 tetA</i></u> <u><i>sul1-sul2-sul3 dfrA12</i></u>	2,000; <i>dfrA12</i> <u><i>orfF aadA2</i></u>	220 (1)
Typhimurium DT104 (29) ^a	O	H (17), S (4), P (1), C (2), U (1), E (3), UN (1)	2000 (1), 2002 (3), 2003 (12), 2004 (13)/north (19), center (1), south (8), UN (1)	<u>Str^r Chl^r Sul^r (Gen^r)</u> <u>Kan^r Amp^r Tet^r Tmp^r</u> <u>Nal^r <i>aadA2-aadA1</i></u> <u><i>cmlA1 sul1-sul2-sul3</i></u> <u>[<i>floR aac(3)-IV</i></u> <u><i>bla</i>_{TEM} <i>tetA tetB</i></u> <u><i>dfrA12</i>]</u>	2,000; <i>dfrA12</i> <u><i>orfF aadA2</i></u>	150 (1), 170 (5), 220 (3), 150 + 170 (1)

^a PCR assay for the identification of *S. enterica* serotype Typhimurium DT104 and U302 phage types (15) positive.

^b Clones are designated by capital letters as previously described (2).

^c H, humans; S, pork products; P, poultry products; C, beef products; U, unknown food product; E, environment; UN, unknown source.

^d Antibiotic resistances and resistance genes transferred to transconjugants are underlined. Variable antibiotic resistance and resistance gene among isolates of the same PFGE are in parentheses. The following genes implicated in antimicrobial resistance were detected by PCR (1, 2, 9): *bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30}, and *bla*_{TEM} encoding β-lactam resistance; *floR*, *cmlA1*, and *catA* encoding chloramphenicol resistance; *tetA*, *tetB* and *tetG* encoding tetracycline resistance; *sul1*, *sul2* and *sul3* encoding sulfonamide resistance; *aac(3)-IV* and *aphA1* encoding, respectively, gentamicin and kanamycin resistance. The characterization of genes associated with streptomycin (*aadA*) and trimethoprim (*dfrA*) resistance was done by PCR amplification and DNA sequencing in isolates carrying those genes inserted into integrons, as described previously (2). Antimicrobial agents were tested as previously described (2). Abbreviations: Str^r, streptomycin resistance; Gen^r, gentamicin resistance; Kan^r, kanamycin resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Nal^r, nalidixic acid resistance; Chl^r, chloramphenicol resistance; Tet^r, tetracycline resistance; Sul^r, sulfamethoxazole resistance; Tmp^r, trimethoprim resistance.

^e Plasmid profiles obtained by S1 PFGE in the isolates selected for testing; the plasmids transferred to transconjugants are underlined.

^f *int1* gene was detected, as previously described (2) in isolates without a positive 5'CS-3'CS PCR assay.

viously (5), with TripleMaster enzyme mix (Eppendorf, Hamburg, Germany) and the primer combinations 5'CS (13) and *cmlA*-B (9), *cmlA*-F (9) and *sul3F* (14), and INT/5CS (16) and *sul3F* (14). (iii) Typing of *sul3*-carrying integrons was performed by a PCR-restriction fragment length polymorphism analysis in which PCR products corresponding to the amplification of the 5' conserved sequence (5'CS)-*cmlA* region and of the *cmlA*-*sul3* region were purified and further digested with TaqI endonuclease (New England BioLabs, Ipswich, MA). PCR products representing the two different amplicons or the complete integron containing the *sul3* gene were sequenced

through a primer-walking strategy with specific designed primers. Sequence comparisons were made with the BLAST program available at the National Center for Biotechnology Information website, and the sequence data for each integron type were deposited in the GenBank database.

The following three *sul3*-associated integrons presenting distinct gene cassette organizations were observed (Fig. 1): type I, 5'CS-*dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3* (7,085 bp); type II, 5'CS-*dfrA12-orfF-aadA2/1-qacH-IS440-sul3* (4,525 bp); type III, 5'CS-*estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3* (7,304 bp). All of the types presented genes coding for strep-

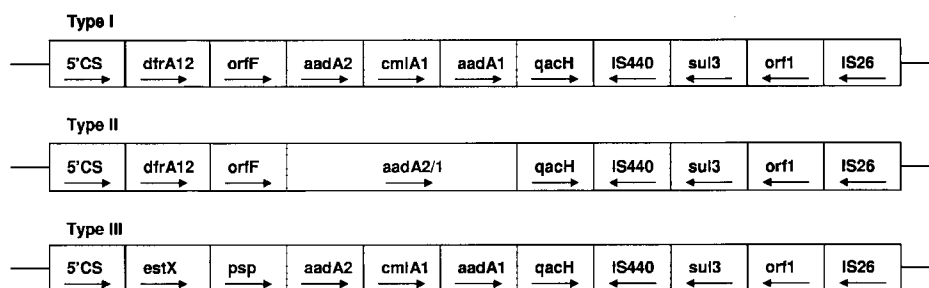


FIG. 1. Organization of the three types of *sul3*-carrying integrons in *Salmonella* (not to scale). Gene orientations are indicated by arrows.

tomycin resistance (*aadA*), including one new hybrid *aadA* gene, and two (types I and III) of them contained the *cmlA1* gene coding for chloramphenicol resistance. In all of the class 1 integron types described in this report, it seems that the *sul3* gene had replaced *sul1* in addition to the replacement of *qacEΔ1* by the *qacH* gene in the 3'CS region.

Two *sul3*-carrying class 1 integrons (types I and II), presenting an original gene cassette organization, were observed in multidrug-resistant (MDR) isolates of four serotypes (Rissen, Typhimurium, IIIb:65:lv:enxz15, and Haifa) corresponding to five clones. Interestingly, of the *S. enterica* serotype Rissen clone isolates, two contained the type I integron and three contained the type II integron. The structure of 7,085 bp (type I) contained the first three gene cassettes (*dfrA12-orfF-aadA2*) typical of a class 1 integron widely disseminated among members of the family *Enterobacteriaceae*, including *Salmonella* (2) and downstream an organization identical to part of the type III structure. In 10 of 12 isolates carrying the type I genetic structure, *sul3* was the only *sul* gene detected. The other new integron structure (type II), only described in the MDR *S. enterica* serotype Rissen clone, contained the first two gene cassettes (*dfrA12-orfF*) typical of class 1 integrons and also present in the type I integron described here, but with a hybrid *aadA* gene cassette as the third gene, suggesting recombination between the *dfrA12-orfF-aadA2* cassette array and an *aadA1* gene cassette (the crossover in the hybrid *aadA2/1* cassette was located between positions 289 and 299 in the cassette). This genetic event and the absence of the *cmlA* gene, before the *qacH-tnp-sul3* sequence, observed in isolates from the same clone, suggest that the type II integron may be a result of evolution (e.g., by an incorrect cassette excision event) from the *sul3*-carrying class 1 type I integron.

Class 1 integron structure type III, identical to that recently described by Bischoff et al. (5) in swine *E. coli* isolates, was observed in the majority ($n = 32$) of the *sul3*-producing *Salmonella* isolates (including the oldest strain from 2000). This genetic structure was located only in MDR *S. enterica* serotype Typhimurium isolates corresponding to three clones. Most of those isolates (24/32) also carried another class 1 integron (*dfrA12-orfF-aadA2* in 23 and *dfrA1-aadA1* in 1) with the *qacEΔ1-sul1* genes as part of the 3'CS. With the exception of one isolate, all presented the three types of *sul* gene simultaneously.

Finally, characterization of the *sul3* genetic context was also performed by PCR with several specific primer combinations (TNP-F-SUL3F and SUL3FR-TNP-R) and sequencing (PCR products and plasmids extracted from transconjugants). Char-

acterization of the *sul3* genetic vicinity showed a gene cluster comprising *sul3* and transposase-like sequences (IS440-*sul3-orf1*-IS26) identical in all of the isolates, with the exception of one (deletion of ca. 500 bp in the *orf1*-IS26 region). The *tnp* gene of IS440 was identical to the one described in an *S. choleraesuis* plasmid (GenBank accession no. AY509004), to the *E. coli* plasmids characterized by Bischoff et al. (5), and also to the partial sequence of the truncated IS440 sequence described by Perreten and Boerlin (14). The insertion sequence observed downstream of the *sul3* gene was identical to IS26, already observed flanking resistance genes, including in several MDR *S. enterica* plasmids (e.g., GenBank accession no. AY333434 and AJ628353). It is of note that the orientation of the IS440-*sul3-orf1*-IS26 element is the opposite of that previously described by Perreten and Boerlin (14), suggesting a different *sul3* gene acquisition event.

Genetic locations of *sul3*-associated integrons. Several methods were used to determine the locations of *sul3*-containing genetic elements. (i) Conjugation assays with *E. coli* K802N (Nal^r Rif^r) as a recipient strain were attempted by mating in agar plates. Transconjugants were selected on Mueller-Hinton agar 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) containing sulfamethoxazole (256 μg/ml) plus nalidixic acid (64 μg/ml) (or 100 μg/ml rifampin if the donor was nalidixic acid resistant). (ii) Plasmid DNA was isolated from donors and transconjugants by several methods (11, 12). The relatedness of plasmids harbored by the transconjugants was determined by single-restriction analysis with EcoRI. For better resolution and sizing of high-molecular-weight plasmids, extraction from selected isolates was also performed by nuclease S1 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) digestion prior to PFGE (3). (iii) Southern blot hybridizations of S1-PFGE patterns were performed by standard methods, by using a nonradioactive technique (Amersham Biosciences) with probes for *sul3* from pVP440 (14) and probes for class 1 integron- and gene cassette-specific sequences (5'CS-*dfrA12* and *estX-psp*).

The *sul3* gene was originally identified on a 54-kb conjugative plasmid (14), but it also appeared to be located on large plasmids of different sizes (6, 8, 14). Sulfonamide resistance and the *sul3* gene were transferred, by conjugation assays, in 5 of 12 isolates carrying genetic structure type I and in all of the isolates carrying genetic structure type II, with cotransference of resistance to trimethoprim and streptomycin. Plasmid characterization by S1-PFGE, followed by Southern hybridizations, demonstrated that plasmids carrying the *sul3* gene cohybridized with specific probes for class 1 integrons and gene cassette-specific sequences. The *sul3* gene and *sul3*-associated

type I and II integrons were located on large plasmids of different sizes (≥ 100 kb) and on identical conjugative plasmids of ca. 70 kb, respectively (Table 1). The conjugative plasmid of ca. 100 kb was the most disseminated among the different clones; although the RFLP with EcoRI showed different profiles between isolates from different clones, several bands were shared between them, suggesting that they are highly related (data not shown). Conjugation experiments failed to demonstrate the occurrence of conjugative transfer of resistance determinants, including *sul3*, from all of the isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 carrying *sul3*-associated integron type III. However, Southern hybridizations after S1-PFGE experiments demonstrated that the *sul3* gene and *sul3*-associated integron type III were located on large plasmids of different sizes (between 150 and 220 kb) (Table 1). One isolate from the environment presented two copies of the *sul3* gene on plasmids of different sizes (150 and 170 kb), both also detected in human and food isolates of the same clone. The conjugative plasmid of ca. 240 kb carrying *sul3* integron type III was only detected on a non-DT104 *S. enterica* serotype Typhimurium isolate (Table 1).

We describe the dissemination of *sul3* associated with plasmid-borne class 1 integrons containing an unusual 3'CS site. The presence of similar *sul3*-integron platforms containing different gene cassette arrays or hybrid genes suggests evolution of the genetic background by different recombinatorial events. The association with epidemic plasmids and particular MDR clones of *Salmonella* might contribute to the maintenance and further spread of modular antibiotic resistance elements from food animals to hospitalized humans, as reported for other *Salmonella* genetic elements (2).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of the *sul3*-carrying integrons reported in this study have been submitted to the EMBL/GenBank sequence databases and assigned accession numbers EF051037 (type I), EF051038 (type II), and EF051039 (type III).

We are very grateful to Teresa Coque (Hospital Ramon et Cajal, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript, V. Perreten (Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Bern, Switzerland) for the control strain with plasmid pVP440, Centro Nacional de *Salmonella* (Lisboa, Portugal) for serotyping of the strains, and CDC for the PFGE protocols and control strain *S. enterica* serotype Braenderup H9812.

The present work was partially supported by FSE/FEDER (POCI/AMB/61814/2004).

REFERENCES

1. Antunes, P., J. Machado, J. C. Sousa, and L. Peixe. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:836–839.
2. Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:297–304.
3. Barton, B. M., G. P. Harding, and A. J. Zuccarelli. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226:235–240.
4. Bean, D. C., D. M. Livermore, I. Papa, and L. M. C. Hall. 2005. Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:962–964.
5. Bischoff, K. M., D. G. White, M. E. Hume, T. L. Poole, and D. J. Nisbet. 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:285–291.
6. Grape, M., L. Sundström, and G. Kronvall. 2003. Sulfonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:1022–1024.
7. Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:489–492.
8. Guerra, B., E. Junker, and R. Helmuth. 2004. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2712–2715.
9. Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, and M. C. Mendoza. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Resist.* 10:83–91.
10. Hammerum, A. M., D. Sandvang, S. R. Andersen, A. M. Seyfarth, L. J. Poesbo, N. Frimodt-Møller, and O. E. Heuer. 2006. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 106:235–237.
11. Handwerger, S., J. Skoble, L. F. Discotto, and M. J. Pucci. 1995. Heterogeneity of the *varA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:362–368.
12. Kado, C. I., and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365–1373.
13. Lévesque, C., L. Piché, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185–191.
14. Perreten, V., and P. Boerlin. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1169–1172.
15. Pritchett, L. C., M. E. Konkel, J. M. Gay, and T. E. Besser. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:3484–3488.
16. Riccio, M. L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2000. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1229–1235.
17. Sköld, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updates* 3:155–160.

Capítulo 3

Conclusão geral

3) Conclusão Geral

I) Isolados de *Salmonella* resistentes a vários grupos de agentes antimicrobianos são frequentes entre isolados Portugueses de várias origens, predominando nos alimentos de origem animal. O estudo da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos revelou resistência a pelo menos um dos antibióticos testados em 57% dos isolados, especialmente nos de origem alimentar. Destaca-se ainda que 26% dos isolados apresentaram resistência múltipla (entre 2 a 8 agentes). Os fenótipos de resistência mais frequentes entre os isolados estudados foram à tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas e ampicilina, principalmente nos isolados de produtos alimentares à base de porco, e ao ácido nalidíxico, principalmente em isolados de produtos avícolas. Estes resultados parecem ser o reflexo do uso intensivo de antibióticos na produção animal em Portugal, nomeadamente de agentes como as tetraciclins, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e quinolonas. Dada a possibilidade de transmissão de *Salmonella* ao homem através da cadeia alimentar, torna-se preocupante a associação crescente de infecções humanas com estirpes resistentes a antibióticos, que consequentemente levam a um aumento da morbilidade e mortalidade em situações de infecções gastrointestinais invasivas em que é fundamental o uso de terapêutica antimicrobiana. Neste sentido, é de salientar a elevada incidência de isolados alimentares e humanos resistentes ao ácido nalidíxico e com diminuição de susceptibilidade à ciprofloxacina, principalmente associada com o serótipo Enteritidis que, até recentemente, se mantinha susceptível à maioria dos antibióticos. Para além disso, é ainda preocupante o número elevado de isolados resistentes à ampicilina, apesar de não produtores de β -lactamases de espectro alargado, devido à possibilidade de insucessos terapêuticos quando é necessário o uso deste agente.

II) O uso ilegal de nitrofuranos na produção animal poderá ter contribuído para a incidência de salmonelose. O uso de antimicrobianos na produção animal intensiva é um problema global de saúde pública, quer por contribuir para a selecção e disseminação da resistência, quer pela possibilidade de persistência de aditivos, ou seus resíduos, indesejáveis nos alimentos de origem animal. No entanto, é também preocupante a possibilidade de alguns agentes antimicrobianos poderem contribuir para

a selecção de determinadas bactérias zoonóticas implicadas em infecções humanas. Com efeito, o uso ilegal e intensivo de nitrofuranos em Portugal, em vários tipos de explorações, mas principalmente nas produções avícolas, poderá ter favorecido a elevada incidência de *S. Enteritidis* em aves e, consequentemente, em humanos e, ainda, ter influenciado a emergência de dois clones de *S. Typhimurium* com resistência múltipla disseminados em todo o país.

III) Todos os genes de resistência a antibióticos identificados em isolados de humanos foram também caracterizados em isolados de alimentos, principalmente nos de origem animal, sugerindo que a produção animal seja a sua fonte. Vários determinantes genéticos associados à resistência a diferentes antimicrobianos foram identificados: β -lactâmicos (*bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-30} e *bla*_{TEM}), aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2* e *aadA5* para estreptomicina; *aac(3)-IV* para gentamicina e *aphA1* para canamicina), fenicóis (*catA*, *floR* e *cmlA1*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*), tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)* e *tet(G)*] e trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA12* e *dfrA17*).

IV) A prevalência e disseminação de isolados de *Salmonella* resistentes a antibióticos poderá estar relacionada com a presença de determinadas estirpes com maior capacidade de adaptação ao ambiente de criação animal e/ou processamento alimentar. Com efeito, entre os vários isolados de *Salmonella* com perfis de resistência múltipla, obtidos em origens e áreas geográficas variadas, foi observado um número reduzido de clones. A sua prevalência e disseminação poderá reflectir não só uma melhor capacidade de sobrevivência a pressões selectivas causadas pelo uso de antibióticos e outros compostos com actividade antimicrobiana usados em produção animal, mas também a presença de outras características que permitam uma melhor adaptação a determinados nichos ecológicos. Entre a população de *Salmonella* estudada foi detectado um clone predominante, o de *S. Typhimurium* DT104, resistente à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (fenótipo ACSSuT), estando associado principalmente a alimentos de origem animal à base de porco e vaca. Desde os anos 90 que esta estirpe, originalmente associada com gado bovino, mas posteriormente disseminada por outros reservatórios animais, se tornou uma das causas mais frequentes de salmonelose em todo o mundo. É ainda de destacar a incidência significativa e a dispersão geográfica nacional, de um outro clone de *S. Typhimurium*, também disseminado em Espanha, contendo o gene que codifica para

uma β -lactamase *bla*_{OXA-30}. Esta estirpe, para além de resistência a diferentes antibióticos (fenótipo ACSSuT na maioria e em alguns isolados resistência adicional ao ácido nalidíxico, gentamicina e/ou trimetoprim) apresenta ainda redução de susceptibilidade a alguns β -lactâmicos de largo espectro, constituindo uma ameaça crescente à saúde pública. Por fim, é ainda preocupante, a presença de um terceiro clone com resistência múltipla pertencente a um serótipo menos frequentemente detectado, *S. Rissen*, e que parece estar a emergir no nosso país.

V) Genes de resistência a vários agentes antimicrobianos de grande utilização em produção animal são frequentemente veiculados por integrões. A ocorrência de integrões, predominantemente de classe 1, foi frequente entre isolados de *Salmonella* de várias fontes e serótipos (especialmente em *S. Typhimurium*) com resistência múltipla, sendo detectados em 78% dos isolados resistentes aos sulfametoxazole. Para além de genes que conferem resistência às sulfonamidas, também se observou a presença de genes inseridos em integrões conferindo resistência a outros antibióticos de grande utilização em produção animal, como a estreptomicina, trimetoprim e ampicilina. A maioria dos tipos de integrões de classe 1, nomeadamente contendo genes *dfrA-aadA*, foram observados em clones do mesmo ou de diferentes serótipos, provenientes de áreas geográficas e origens diversas. Todos os tipos de integrões estavam distribuídos entre isolados de origem humana e alimentar, ocorrendo uma maior diversidade em alimentos à base de porco. Além disso, foi observada uma baixa diversidade de tipos de integrões, o que sugere uma grande estabilidade desses elementos entre os isolados de *Salmonella*, associada, eventualmente, a uma disseminação elevada de estruturas genéticas específicas em que esses elementos poderão estar inseridos. Adicionalmente, a co-transferência em cerca de 90% dos casos dos genes *bla*_{TEM}, *tetA* e *tetB* com integrões, sugere a possibilidade desses genes estarem localizados no mesmo elemento genético móvel, nomeadamente plasmídeos conjugativos. A existência no metagenoma da produção animal de *clusters* de genes conferindo resistência a diferentes antimicrobianos permite, pela utilização de um único agente, a selecção de isolados com resistência múltipla que assim conseguem resistir às diferentes pressões selectivas a que estão habitualmente submetidos na produção de animais para consumo humano. É de salientar, contudo, a detecção de alguns tipos de integrões específicos de determinadas estirpes, nomeadamente o de 2000 bp (*bla*_{OXA-30}-*aadA1*) em *S. Typhimurium* e os de

1000 bp (*aadA2*) e/ou 1200 bp (*bla*_{PSE-1}) no clone DT104 e num clone de *S. Derby*, sugerindo a distribuição de variantes da SGI1 em vários serótipos.

VI) A dispersão de clones e/ou de elementos genéticos móveis possuindo *clusters* de genes contendo *sul3* associado a integrões de classe 1 atípicos poderá contribuir para a manutenção de estirpes de *Salmonella* com resistência múltipla. A disseminação do gene *sul3* em isolados de diferentes fontes, serótipos e clones ocorre associada a integrões de classe 1 atípicos (os genes *sul3* e *qacH* substituíram os genes *sul1* e *qacEΔ1*, respectivamente, na região 3'CS) localizados em plasmídeos. Neste trabalho, descreveu-se a presença do gene *sul3* em estruturas similares tipo transposição (*IS440-sul3-orf1-IS26*) localizadas imediatamente após três combinações diferentes de cassetes de genes. Salienta-se a presença de um gene híbrido (*aadA2/1*) num dos elementos e um gene (*cmlA*), pouco frequente entre isolados de *Salmonella*, em outros dois elementos. A associação destas estruturas com plasmídeos relacionados e clones particulares de *Salmonella* com resistência múltipla poderá contribuir para a manutenção e futura dispersão de elementos genéticos modulares ("clusters") que codificam para resistência a antibióticos.

Considerações finais:

i)

Os nossos dados sugerem que os animais destinados à produção de alimentos devem ser considerados simultaneamente reservatório de clones e de unidades de captura genética de transferência horizontal contendo frequentemente *clusters* de genes de resistência, tornando assim a cadeia alimentar, especialmente os alimentos à base de porco, uma possível fonte de isolados com resistência múltipla para o Homem. O uso intensivo de antibióticos ao longo de vários anos deverá ter contribuído para a selecção de determinados clones, de integrões e de elementos genéticos contendo integrões, embora outros factores relacionados com o ambiente de produção animal também possam ter contribuído para a sua disseminação e especificidade de nicho ecológico.

ii)

Uma vez que *Salmonella* é um patógeno transmitido fundamentalmente através de alimentos, cuja produção e distribuição ocorre actualmente numa escala global, será fundamental implementar, a nível nacional, sistemas de vigilância da resistência a antibióticos, em estreita coordenação com os programas internacionais, de modo a ser possível implementar as medidas de prevenção e controlo adequadas para evitar a disseminação de bactérias resistentes.

iii)

A análise e caracterização dos clones e dos elementos genéticos de transmissão horizontal em populações de *Salmonella* de várias origens poderá proporcionar informação fundamental para o estudo da evolução desses elementos genéticos, de modo a ser possível estimar o risco para a saúde e implementar estratégias de intervenção para prevenir a disseminação de genes de resistência a agentes antimicrobianos através da cadeia alimentar dos animais ao Homem.

Capítulo 4

Anexos

I) Material e Métodos

1) Isolados

Foram incluídos neste estudo 1511 isolados de *Salmonella* provenientes de várias origens entre 2002 e 2004 em Portugal. A colecção de isolados foi obtida do Centro Nacional de *Salmonella* (INSA, Lisboa, Portugal) e de laboratórios de microbiologia alimentar e/ou clínica de várias regiões do país.

Os isolados foram obtidos de várias origens, nomeadamente isolados clínicos humanos (n=1057) provenientes de hospitais e de ambulatório (57 unidades); isolados de produtos alimentares (n=350), incluindo isolados de produtos derivados de aves (n=128), de porco (n=110) e de vaca (n=17), de alimentos de origens diversas (n=33) e de alimentos de origem desconhecida (n=62); para além de isolados ambientais (n=92) e de isolados de origem desconhecida (n=12).

Os isolados enviados para o laboratório, previamente identificados por provas bioquímicas como sendo *Salmonella*, foram sujeitos a provas de aglutinação com soro polivalente anti-*Salmonella* (Difco *Salmonella* O Antiserum Poly A-I and Vi) e vários soros específicos para o antígeno O (Difco). Todos os isolados foram congelados a -70°C em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) com 15% de glicerol.

Os serótipos foram determinados no Centro Nacional de *Salmonella*, de acordo com o esquema de Kauffmann-White. Alguns isolados serotipados como sendo do serótipo Enteritidis foram também sujeitos a fagotipagem, de acordo com a disponibilidade do Centro Nacional de *Salmonella*. Adicionalmente, foi implementado, no decurso do presente trabalho, um ensaio de PCR para identificação dos fagotipos DT104 e U302 em isolados do serótipo Typhimurium. Pritchett *et al* (2000) desenvolveram um PCR multiplex cujo alvo de amplificação é o gene *invA*, factor de virulência presente em quase todos os isolados de *Salmonella*, e uma região exclusiva dos isolados dos fagotipos DT104 e U302. Os *primers*, concentrações dos reagentes e condições de amplificação encontram-se descritos na Tabela 1 e 2 deste capítulo.

2) Ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos

2.1) Método de diluição em agar

Os perfis de susceptibilidade dos isolados de *Salmonella* foram determinados pelo método de diluição em agar, utilizando o meio de *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux) após incubação das placas a 37 °C durante 18 a 24h, de acordo com os procedimentos publicados pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, anteriormente designado *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (NCCLS, 2003). A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano foi registada como sendo a concentração mínima inibitória (CMI). Os isolados ensaiados foram classificados nas categorias sensível, intermédia ou resistente, de acordo com o proposto pelas tabelas do CLSI (NCCLS, 2003) para *Enterobacteriaceae*, com excepção da estreptomicina, não contemplada por essas normas, em que se optou pelas tabelas publicadas no DANMAP (*The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*) (2004). A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controlo (NCCLS, 2003).

Os agentes antimicrobianos avaliados e as concentrações limites escolhidas foram as seguintes: estreptomicina (Sigma) (1-256 µg/ml), canamicina (Sigma) (1-64 µg/ml), gentamicina (Sigma) (0,125-16 µg/ml), ampicilina (Sigma) (1-64 µg/ml), ácido nalidíxico (Sigma) (2-64 µg/ml), ciprofloxacina (0,125-1 µg/ml), cloranfenicol (Sigma) (2-64 µg/ml), tetraciclina (Sigma) (2-32 µg/ml), sulfametoxazole (Sigma) (128-512 µg/ml), trimetoprim (Sigma) (2-16 µg/ml) e nitrofurantoína (Sigma) (1-128 µg/ml).

2.2) Avaliação da susceptibilidade a antibióticos β-lactâmicos e da expressão das β-lactamases

2.2.1) Método de difusão em agar com discos / prova da acção sinérgica de dois discos

Em todos os isolados resistentes à ampicilina, a presença de um fenótipo característico da produção de β-lactamases de espectro alargado (ESBL, *extended-spectrum β-lactamase*) foi determinado pela prova da acção sinérgica de dois discos

(Jarlier *et al*, 1988). Os fenómenos de sinergismo foram avaliados segundo a técnica de difusão em agar com discos (NCCLS, 2002), aplicando um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg) próximo de discos de ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), cefuroxima (30µg), aztreonamo (30µg), ceftriaxona (30µg) e cefepima (30µg) na placa de *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux).

2.2.2) Método de difusão em agar com tiras (E-test)

Adicionalmente, para a determinação da CMI de alguns antibióticos β -lactâmicos foi utilizado o método de difusão em agar com tiras, designado por Etest (AB Biodisk). A técnica foi executada de acordo com as instruções do fabricante usando *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux) e uma incubação a 37 °C durante 18 h. Os isolados ensaiados foram classificados nas categorias sensível, intermédia ou resistente, de acordo com o proposto pelas tabelas do CLSI (NCCLS, 2003) para *Enterobacteriaceae*. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controlo (NCCLS, 2003). Foram determinadas em alguns isolados as CMIs para os seguintes antibióticos β -lactâmicos: amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico, cafalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma, imipenemo, meropenemo, ertapenemo e aztreonamo.

2.2.3) Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases

No presente estudo foi utilizado o método de Matthew *et al* (1975) modificado para caracterizar o ponto isoeléctrico das β -lactamases responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos. As estirpes foram semeadas em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) a 37 °C durante 18h (*overnight*). Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 min., a 4 °C, sendo os sedimentos obtidos lavados com soro fisiológico, novamente centrifugados nas mesmas condições e ressuspensos em 500 µl de água destilada. As suspensões obtidas foram colocadas em tubos Eppendorf e sujeitas a choques térmicos. Por fim, foram centrifugados a 13000 rpm durante 1 min. e os sobrenadantes congelados a -20°C até posterior utilização.

O ponto isoeléctrico das β -lactamases em estudo foi determinado por focagem isoeléctrica em sistema PhastSystem (Pharmacia AB), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados geles comerciais de poliacrilamida com anfolitos de gradiente de pH de 3 a 9 (PhastGel IEF 3-9, Amersham Biosciences) e as β -lactamases foram visualizadas com solução de Nitrocefim (100 μ M). Paralelamente utilizou-se um padrão constituído por extractos de estirpes produtoras de β -lactamases de pIs conhecidos (5,4; 5,7; 7; 7,4 e 8,2).

3) Caracterização de genes de resistência a antibióticos

No presente trabalho foram pesquisados por PCR genes que codificam para a resistência a vários grupos de antibióticos mais frequentemente detectados em isolados de *Salmonella* (Tabela 1).

3.1) Condições gerais das reacções de amplificação de DNA por PCR

3.1.1) Obtenção de DNA total

O DNA total dos isolados em estudo foi obtido utilizando o método descrito por Seifert *et al* (1997). Os isolados submetidos a PCR foram previamente isolados em meio de *CLED*, após incubação a 37°C durante um período de 18 a 24h. De cada placa foi retirada uma porção (3 a 4 colónias) para efectuar uma suspensão em 20 μ l de solução NaOH-SDS (0,05M NaOH; 0,25% SDS), posteriormente sujeita a uma fase de lise a 95°C durante 15 min. em termociclador. Os lisados bacterianos foram diluídos até 200 μ l de volume final com TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8,0) e centrifugados a 13000 rpm durante 3 min. Os sobrenadantes obtidos, contendo o DNA de cada isolado, foram conservados a -20°C para utilização posterior nas várias reacções de PCR.

3.1.2) Condições de amplificação

Os *primers*, reagentes, temperaturas e tempos necessários à amplificação utilizados nas diferentes reacções de PCR encontram-se discriminados na Tabela 1 e 2. Os termocicladores utilizados foram: *iCycler* (BioRad) ou *MyCycler* (BioRad). Os *primers* específicos para cada reacção de PCR foram sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*.

3.1.3) Electroforese em gel de agarose

Os produtos das reacções de PCR foram separados por electroforese em geles de agarose a 1,2% em tampão TAE (Tris-base 40mM, EDTA 1mM, ácido acético glacial, pH 8) a 90V durante cerca de 60 min. Os geles foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e o tamanho dos fragmentos obtidos foi calculado com o programa de software *Kodak Digital Science ID* por comparação da sua mobilidade com o marcador de peso molecular utilizado (*100bp DNA Ladder, Promega* ou *250bp DNA Ladder, Invitrogen*).

3.1.4) Purificação dos produtos de amplificação

Os produtos resultantes das reacções de PCR obtidos para sequenciação ou digestão com enzimas foram previamente purificados utilizando o *GFX PCR DNA and gel band Purification Kit* (Amersham Biosciences) ou *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os produtos purificados foram conservados a -20°C para posterior utilização.

4) Detecção e caracterização de integrões de classe 1 e de classe 2

4.1) Detecção de integrões

A presença de integrões de classe 1 foi pesquisada por PCR, utilizando *primers* específicos para as regiões conservadas 5'CS e 3'CS e para o gene *intI1* (Tabela 1 e 2)

em todos os isolados resistentes ao sulfametoxazole. Adicionalmente, nesses isolados foi efectuada a caracterização do segmento conservado 3'CS por PCR com *primers* específicos para os genes *qacEΔ1* e *sul1* (Tabela 1 e 2).

Os integrões de classe 2 foram detectados por PCR utilizando *primers* específicos para o gene *intI2* (Tabela 1) e subsequentemente as regiões variáveis desses integrões foram amplificadas usando *primers* hep74 e hep 51 (Tabela 1 e 2) para a zona *attI2-orfX*.

4.2) Tipagem de integrões

Para determinar o conteúdo das regiões variáveis dos integrões de classe 1 procedeu-se a uma abordagem com três tipos de metodologias (PCR, PCR-RFLP e sequenciação), baseada no proposto por Guerra *et al* (2000). Primeiro, o *primer* para a região 5'CS foi usado em combinação com *primers* para vários genes responsáveis por resistência a antibióticos (Tabela 1 e 2). Posteriormente, a tipagem dos integrões de classe 1 e de classe 2 foi efectuada por uma análise de PCR-RFLP. Assim, os produtos de PCR correspondentes à amplificação da região 5'CS-3'CS dos integrões de classe 1 e da região *attI2-orfX* dos integrões de classe 2, foram purificados e digeridos com 5U da endonuclease *TaqI* (New England Biolabs) a 65°C durante 60 min. Os produtos da restrição foram analisados por electroforese em geles de agarose a 2% em tampão TAE a 40V durante 120 min. Foram atribuídas letras romanas aos diferentes tipos de integrões obtidos representando os diferentes tamanhos e perfis de restrição. Por fim, os produtos de PCR representativos de cada perfil foram enviados para sequenciar em sequenciadores automáticos na *4base lab* (Alemanha) ou na *Unidade de Genómica do Parque Científico de Madrid, Universidad Autónoma de Madrid* (Espanha). As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação foram comparadas com outras descritas e depositadas na base de dados *GenBank*, utilizando o BLASTN (*NCBI, National Center for Biotechnology Information*) como ferramenta de alinhamento de sequências. Em alguns casos descritos no presente trabalho, as respectivas sequências foram depositadas na base de dados *GenBank* através do programa *sequin* (*NCBI*).

5) Detecção e caracterização de integrões atípicos

Para determinar a estrutura dos integrões contendo o gene *sul3* procedeu-se à implementação e optimização de reacções de PCR longas, utilizando vários conjuntos de *primers* e enzimas de alta fidelidade (TripleMaster Polymerase Mix, Eppendorf), baseados na metodologia proposta por Bischoff *et al* (2005). As combinações de *primers* utilizadas foram as seguintes: INT5'CS - SUL3F, 5'CS - *cmlA*-R e *cmlA*-F - SUL3F (Tabela 1 e 2). A tipagem dos integrões contendo o gene *sul3* foi efectuada por uma análise de PCR-RFLP, em que os produtos de PCR correspondentes à amplificação das regiões 5'CS-*cmlA* e *cmlA*-*sul3* foram purificados e digeridos com 5U da endonuclease *TaqI* (New England Biolabs) a 65°C durante 60 min. Os produtos de PCR obtidos nessas reacções de amplificação foram enviados para sequenciar, seguindo-se uma estratégia de *primer-walking* usando *primers* específicos desenhados para o efeito (Tabela 3). As sequências obtidas foram analisadas e depositadas na base de dados *GenBank*, como descrito anteriormente.

A caracterização do ambiente genético do gene *sul3* e associação com estruturas tipo transposição foi também efectuada por PCR utilizando várias combinações de *primers* específicos, TNP-F - SUL3F e SUL3FR - TNP-R (Tabela 1), e sequenciação dos produtos de PCR e/ou dos plasmídeos extraídos dos transconjugantes.

6) Estudo da relação clonal

O estudo da relação clonal foi determinado em isolados de *Salmonella* resistentes ao sulfametoxazole usando o método de electroforese em campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). A preparação do DNA total bacteriano para genotipagem por PFGE foi realizada de acordo com o método de referência usado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) para *Salmonella* (CDC, 2002).

6.1) Preparação do DNA para PFGE

A partir de culturas puras em meios ricos (agar sangue ou agar chocolate, bioMérieux) com 18h de incubação a 37°C, prepararam-se suspensões bacterianas em 1 ml do tampão de suspensão CSB (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8,0). Transferiram-

se 200 µl de cada suspensão para um tubo de microcentrifuga, ao qual se adicionaram 10 µl de proteinase K (20 mg/mL) e 200 µl de 1% agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience): 1% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma) em tampão TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8,0). Esta mistura foi imediatamente colocada em moldes apropriados, deixando-se solidificar à temperatura ambiente durante 10-15 min. Depois de solidificados, os blocos de agarose foram colocados em contacto com a solução de lise, constituída por 5 ml de tampão de lise (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% sarcosil) e 25 µl de proteinase K (20 mg/mL), ficando a 54°C cerca de 3h em banho com agitação constante e vigorosa (175-200 rpm). Posteriormente, a solução de lise foi retirada, seguindo-se a lavagem dos blocos de agarose primeiro com água ultrapura estéril pré-aquecida a 50°C (2 lavagens) e depois com o tampão TE pré-aquecido a 50°C (4 lavagens) em períodos de 15 min. a 50°C num banho com agitação vigorosa. Fragmentos de cerca de 1/3 de cada bloco de agarose foram digeridos com 25U da enzima de restrição *XbaI* (New England Biolabs) a 37°C durante um período de cerca de 18h. O DNA genómico da estirpe de referência *S. Braenderup* H9812, obtida do CDC, foi também digerido com *XbaI* e usado como marcador de peso molecular.

6.2) Separação dos fragmentos de DNA por PFGE

A electroforese foi realizada em gel de agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience) a 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 1mM EDTA, ácido bórico), num aparelho CHEF DR-III (BioRad), com as seguintes condições: pulsos de 2,2-63,8s, 14°C, 6V/cm e 19h. A adição de tio-ureia (10mg/mL) ao tampão TBE 0,5X foi efectuada em casos de estirpes de *Salmonella* não tipáveis, tal como recomendado pelo CDC (2002).

6.3) Visualização e interpretação do perfil electroforético obtido por PFGE

Os geles foram corados com brometo de etídio (10 µg/ml) durante 30 min. e, quando necessário, descorados com água durante 10-15 min. com agitação suave. As imagens dos geles foram digitalizadas com o programa de software *Kodak Digital Science ID*. As relações clonais foram estabelecidas de acordo com os critérios de Tenover *et al* (1995), sendo considerados do mesmo clone os isolados que

apresentavam um perfil de macrorestrição que diferia no máximo de 3 bandas. Os clones foram designados por letras maiúsculas e os subtipos foram definidos colocando um número inferior à linha que indicava o número de bandas que diferem do isolado considerado o tipo de PFGE inicial.

7) Estudo da transferência da resistência

7.1) Ensaios de conjugação

Nos isolados que apresentaram resistência ao sulfametoxazole efectuaram-se ensaios de transferência genética, nomeadamente conjugação em meio sólido. Utilizou-se como estirpe receptora *Escherichia coli* K802N, resistente ao ácido nalídixico e à rifampicina e desprovida de plasmídeos. As estirpes dadoras e a estirpe receptora foram semeadas em *Tryptone Soya Broth* (TSB, Oxoid) a 37°C durante 18h. Posteriormente, transferiu-se cerca de 1 ml destas culturas para 50 ml de TSB e incubou-se a 37°C num banho com agitação durante cerca de 3h. Em placas de *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux) colocaram-se 100 µl da cultura da estirpe dadora sobre 100 µl da cultura da estirpe receptora, incubando-se a 37°C durante 18-24h. Da cultura obtida foi preparada uma suspensão-mãe e várias diluições decimais em soro fisiológico. Os transconjugantes foram seleccionados em *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux) contendo ácido nalídixico (64 µg/ml) (ou 100 µg/ml de rifampicina se a estirpe dadora fosse resistente ao ácido nalídixico) e sulfametoxazole (256 µg/ml) ou ampicilina (64 µg/ml) em alguns casos.

7.2) Análise plasmídica

7.2.1) Extracção de DNA plasmídico

7.2.1.1) Metodologias convencionais

Um dos protocolos utilizados no presente trabalho para a extracção de DNA plasmídico foi um método de Kado & Liu (1981) modificado. Das culturas bacterianas em caldo de LB (*Luria-Bertani medium*) incubadas a 37°C *overnight*, procedeu-se à

centrifugação de 1,5 ml a 14000 rpm durante 5 min. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 20 µl de tampão (50 mM Tris:1mM EDTA, pH 8), adicionou-se 100 µl da solução de lise (3% SDS, 50mM Tris, 75mM NaOH) e inverteu-se suavemente cada tubo. Após incubação a 58°C cerca de 30 min. num banho, foram adicionados 100 µl de fenol-clorofórmio, seguindo-se uma agitação suave e centrifugação a 3500 rpm durante 30 min. Por fim, retirou-se a fase aquosa obtida para um novo tubo e congelou-se a -20°C até ser analisada por electroforese em gel de agarose.

Outra técnica implementada para detecção de plasmídeos em isolados de *Salmonella* foi a extracção de plasmídeos em pequena escala de Handwerger *et al* (1995). Das culturas bacterianas em caldo de LB incubadas em banho com agitação suave a 37°C *overnight*, procedeu-se à centrifugação de 5 ml a 4000 rpm durante 15 min. Posteriormente, o sedimento foi lavado com 100 µl de TEG (50 mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA e 2% glicose) e centrifugado a 13000 rpm durante 5 min. O sobrenadante obtido foi rejeitado e o sedimento foi ressuspenso em 200 µl de TEG, adicionou-se 400 µl da solução de lise (1% SDS, 0,2N NaOH) e agitou-se bem invertendo 4 a 6 vezes cada tubo. Seguidamente, adicionou-se 300 µl de acetato de potássio (3M, pH 5) e congelou-se a -20°C durante cerca de 3h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm durante 15 min. e ao sobrenadante obtido (700 µl) adicionou-se o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), inverteram-se os tubos com cuidado e voltou-se a centrifugar 5 min. a 13000 rpm. Ao sobrenadante obtido (500 µl) juntou-se o mesmo volume de clorofórmio, inverteram-se os tubos com cuidado e voltou-se a centrifugar 5 min. a 13000 rpm. Por fim, o sobrenadante obtido (400 µl) foi precipitado com 2 volumes de etanol, invertendo-se os tubos 4 a 6 vezes, e foram colocados à temperatura ambiente 1 a 1,5h. Depois, procedeu-se à centrifugação a 13000 rpm durante 10 min. e lavou-se o sedimento 3 vezes com etanol a 70%. Após evaporação do etanol, o sedimento foi ressuspenso em 30 µl de água ultrapura estéril e armazenado a 4°C até ser analisado por electroforese em gel de agarose.

7.2.1.2) Metodologias rápidas (kits comerciais)

No presente trabalho os plasmídeos contidos em alguns isolados de *Salmonella* e respectivos transconjugantes foram extraídos utilizado-se o *Qiagen Plasmid Midi Kit* (QIAGEN). Esta metodologia baseia-se no método de desnaturação por lise alcalina

com passagem por coluna que adsorve o DNA plasmídico e eluição com água ultrapura estéril.

7.2.1.3) Electroforese em gel de agarose

A electroforese do DNA plasmídico foi efectuada em geles de agarose com uma concentração de 0,8% em tampão TBE 0,5X a 120V durante cerca de 180 min. Os geles foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante cerca de 30 min. e o tamanho das bandas obtidas foi calculado com o programa de software *Kodak Digital Science ID* por comparação da sua mobilidade com os plasmídeos das estirpes padrão *E.coli* V517 (8 plasmídeos variando de 2,1 a 54,4 Kb) e/ou *E.coli* NTCT 50192 (4 plasmídeos de 7; 36,2; 63,8 e 148,5 Kb).

7.2.2) Perfis de restrição dos plasmídeos (RFLP)

Nos plasmídeos extraídos dos transconjugantes procedeu-se à avaliação dos tamanhos e ao estabelecimento de relações entre eles utilizando-se uma análise de restrição simples com várias enzimas, nomeadamente *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*. A electroforese foi efectuada em geles de agarose com uma concentração de 0,8% em tampão TBE 0,5X a 40V durante cerca de 12h. Os geles foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante cerca de 30 min. e o tamanho das bandas obtidas foi calculado com o programa de software *Kodak Digital Science ID* por comparação da sua mobilidade com o marcador de peso molecular utilizado (Lambda DNA/*HindIII* Markers, *Promega*).

7.2.3) Técnica S1-PFGE e hibridação de sondas de DNA

Para se poder detectar e determinar o tamanho de plasmídeos de elevado peso molecular contendo integrões de classe 1 com o gene *sul3* utilizou-se uma técnica que envolve a digestão com a nuclease S1 antes do PFGE, desenvolvida por Barton *et al* (1995). A preparação dos blocos de agarose e as condições de electroforese usadas foram as mesmas usadas para a genotipagem por PFGE (ver ponto 6), com excepção das bactérias terem sido semeadas em *Mueller-Hinton agar 2* (bioMérieux) contendo sulfametoxazole (256 µg/ml). Os blocos de agarose preparados a partir destas culturas

em meio selectivo foram tratados com cerca de 3 U de S1 nuclease (Amersham Biosciences) a 37°C durante 45 min.

Os plasmídeos obtidos após electroforese em campo pulsado foram transferidos para uma membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences) utilizando a técnica de *Southern blot* durante cerca de 24h. O DNA foi posteriormente fixado à membrana com luz ultravioleta durante 2 min. Sondas de diferentes tamanhos, correspondendo aos diferentes genes (*sul3*) ou regiões genéticas (5'CS-*dfrA12* e *sat-*psp**), foram obtidas por PCR usando *primers* específicos (Tabela 2 e 3). Foram calculadas as temperaturas adequadas para hibridação com cada uma das sondas de acordo com o seu conteúdo em GC. A marcação das sondas e a detecção dos genes na membrana de nylon foram executadas com o kit *Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante. Foram utilizadas estirpes de *Salmonella* não contendo gene *sul3* como controlo negativo e a estirpe com o plasmídeo pVP440 (Perreten & Boerlin, 2003) contendo o gene *sul3* como controlo positivo.

Tabela 1: Descrição dos *primers*, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reacções de PCR

Objectivo	Primers	Reagentes	Condições de amplificação	Tamanho do produto (bp)
Pesquisa de integrões de classe 1	5'CS e 3'CS	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf), 200 µM de cada dNTP, 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-1min, 53°C-1min, 72°C-6min (35 ciclos); 72°C-16min (1 ciclo)	variável
Caracterização da zona 3'CS dos integrões de classe 1	QACED1 F e SUL1 B	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 63°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	800
Caracterização da zona variável dos integrões de classe 1	5'CS e ANT(3'')-IA R 5'CS e DFRA12 5'CS e PSE-1 B	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
	5'CS e DHFRL R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 53°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
	5'CS e OXA-III R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 55°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
Pesquisa de genes de resistência às sulfonamidas (<i>sul1</i> e <i>sul2</i>) e integrase de classe 1 (<i>intI1</i>)	SUL1-F, SUL1-R, SUL2-F, SUL2-R, INT-F e INT-R	Tampão 1X, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 0,5U Taq Polimerase e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 69°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	<i>sul1</i> – 433 <i>sul2</i> – 293 <i>intI1</i> – 898
Pesquisa de gene de resistência às sulfonamidas (<i>sul3</i>)	SUL3-F e SUL3-R	Tampão 1X, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 0,5U Taq Polimerase e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 51°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	789
Pesquisa de integrase de classe 2 (<i>intI2</i>)	INT2-F e INT2-R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 62°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	788
Caracterização da zona variável dos integrões de classe 2	hep54 e htp51	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-12 min (1 ciclo); 94°C-1min, 63°C-1min, 72°C-6min (35 ciclos); 72°C-10min (1 ciclo)	variável
Identificação do fagotipo DT104 e U302	DT104F, DT104R, INVA1 e INVA2	Tampão 1X, 2mM MgCl ₂ , 1µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,25U Taq Polimerase e 5 µl DNA	96°C-1 min (1 ciclo); 96°C-30s, 60°C-30s, 72°C-35s (30 ciclos); 72°C-30s (1 ciclo)	<i>invA</i> – 243 DT104/U302 - 162
Pesquisa de genes de resistência	OXAIII-F e OXAIII-R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	96°C-5 min (1 ciclo); 96°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	427
	TEM-F e TEM-R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3µM de cada primer e 2 µl DNA	94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-1min, 58°C-1min, 72°C-1min (35 ciclos); 72°C-10min (1 ciclo)	900

	tetA-F, tetA-R, tetB-F, tetB-R, tetG-F e tetG-R	Tampão 1X, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2μM de cada primer, 200 μM de cada dNTP, 0,5U Taq Polimerase e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	<i>tetA</i> - 210 <i>tetB</i> - 600 <i>tetG</i> - 500
	catA-F, catA-R, cmlA-F, cmlA-R, floR-F e floR-R	Tampão 1X, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2μM de cada primer, 200 μM de cada dNTP, 0,5U Taq Polimerase e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	<i>catA</i> - 623 <i>cmlA</i> - 435 <i>floR</i> - 868
	aac(3)-IV-F, aac(3)-IV-R, aphA1-F e aphA1-R	Tampão 1X, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2μM de cada primer, 200 μM de cada dNTP, 0,5U Taq Polimerase e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos); 72°C-8min (1 ciclo)	<i>aac(3)-IV</i> - 674 <i>aphA1</i> - 461
	QnrA-A e QnrA-B	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	<i>qnrA</i> - 660
	FQ1 e FQ2	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 53°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	<i>qnrB</i>
	qnrS-fw e qnrS-rv	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-1 min (1 ciclo); 94°C-1min, 58°C-2 min, 72°C-3min (34 ciclos); 72°C-7 min (1 ciclo)	<i>qnrS</i> - 566
	Pesquisa de integrrões atípicos			
	INT5'CS e SUL3F	TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf), 200 μM de cada dNTP, 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-1min, 58-62°C-1min, 72°C-10min (35 ciclos); 72°C-16min (1 ciclo)	variável
	5'CS e cmlA-R	TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf), 200 μM de cada dNTP, 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
	cmlA-F e SUL3F	TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf), 200 μM de cada dNTP, 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
	TNP-F e SUL3F	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável
	SUL3FR e TNP-R	PCR SuperMix (Invitrogen), 0,3μM de cada primer e 2 μl DNA	94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-30s, 56°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos); 72°C-5min (1 ciclo)	variável

Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reacções de PCR

Primer	Sequência (5'-3')	Aplicação	Referência
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Integrões classe 1	Lévesque <i>et al</i> , 1995
3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	Integrões classe 1	Lévesque <i>et al</i> , 1995
QACED1 F	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	Integrões classe 1 (3'CS)	Sandvang <i>et al</i> , 1998
SUL1 B	GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC	Integrões classe 1 (3'CS)	Sandvang <i>et al</i> , 1998
ANT(3'')-IA R	ATT GCC CAG TCG GCA GCG	Integrões classe 1 (<i>aadA</i>)	Sandvang <i>et al</i> , 1998
PSE-1 B	CTG GTT CAT TTC AGA TAG CG	Integrões classe 1 (<i>pse-1</i>)	Sandvang <i>et al</i> , 1998
DHFRL R	AGC TGT TCA CCT TTG GC	Integrões classe 1 (<i>dfrA1</i>)	Lévesque <i>et al</i> , 1995
DFRA12	GCA TTG GGA AGA AGG CGT CAC	Integrões classe 1 (<i>dfrA12</i>)	Lee <i>et al</i> , 2001
OXAI1-F	TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT	Integrões classe 1 (<i>blaOXA-30</i>)	Bert <i>et al</i> , 2002
OXAI1-R	TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG	Integrões classe 1 (<i>blaOXA-30</i>)	Bert <i>et al</i> , 2002
DT104F	GTC AGC AGT GTA TGG AGC GA	Fagotipo DT104	Pritchett <i>et al</i> , 2000
DT104R	AGT AGC GCC AGG ACT CGT TA	Fagotipo DT104	Pritchett <i>et al</i> , 2000
INVA-1	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT	<i>invA</i>	Pritchett <i>et al</i> , 2000
INVA-2	AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT	<i>invA</i>	Pritchett <i>et al</i> , 2000
TEM-F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	<i>blaTEM</i>	Peixe <i>et al</i> , 1997
TEM-R	CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	<i>blaTEM</i>	Peixe <i>et al</i> , 1997
SUL1-F	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	<i>sul1</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
SUL1-R	GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	<i>sul1</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
SUL2-F	GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	<i>sul2</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
SUL2-R	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT	<i>sul2</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
INT-F	GCC ACT GCG CCG TTA CCA CC	<i>int11</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
INT-R	GGC CGA GCA GAT CCT GCA CG	<i>int11</i>	Kerrn <i>et al</i> , 2002
SUL3F	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG	<i>sul3</i>	Perreten & Boerlin, 2003
SUL3R	CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA	<i>sul3</i>	Perreten & Boerlin, 2003
INT2-F	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	<i>int12</i>	Mazel <i>et al</i> , 2000
INT2-R	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	<i>int12</i>	Mazel <i>et al</i> , 2000
hep74	CGG GAT CCC GGA CGG CAT GCA CGA TTT GTA	Integrões classe 2	White <i>et al</i> , 2001
htp51	GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG	Integrões classe 2	White <i>et al</i> , 2001
tetA – F	GCT ACA TCC TGC TTG CCT	<i>tetA</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
tetA – R	CAT AGA TCG CCG TGA AGA	<i>tetA</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
tetB – F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	<i>tetB</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
tetB – R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	<i>tetB</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
tetG – F	GCT CGG TGG TAT CTC TGC	<i>tetG</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
tetG – R	AGC AAC AGA ATC GGG AAC	<i>tetG</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
catA – F	CCA CCG TTG ATA TAT CCC	<i>catA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
catA – R	CCT GCC ACT CAT CGC AGT	<i>catA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
cmlA – F	TGT CAT TTA CGG CAT ACT CG	<i>cmlA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
cmlA – R	ATC AGG CAT CCC ATT CCC AT	<i>cmlA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
floR – F	CAC GTT GAG CCT CTA TAT	<i>floR</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
floR – R	ATG CAG AAG TAG AAC GCG	<i>floR</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
aac(3) - IV – F	GTT ACA CCG GAC CTT GGA	<i>aac(3)-IV</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
aac(3) - IV – R	AAC GGC ATT GAG CGT CAG	<i>aac(3)-IV</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
aphA1 – F	AAA CGT CTT GCT CGA GGC	<i>aphA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
aphA1 – R	CAA ACC GTT ATT CAT TCG TGA	<i>aphA1</i>	Guerra <i>et al</i> , 2004
TNP-F	ATC GAG CTC CTT TGC CAG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
SUL3FR	CGA TTC CAA AAA TCT TGC TC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
TNP-R	GCG AAA TGC GCC TGG TAA GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
INTS'CS	CTT CTA GAA AAC CGA GGATGC	Integrões classe 1 atípicos	Riccio <i>et al</i> , 2000
QnrA-A	GGG TAT GGA TAT TAT TGA TAA AG	<i>qnrA</i>	Wang <i>et al</i> , 2003
QnrA-B	CTA ATC CGG CAG CAC TAT TA	<i>qnrA</i>	Wang <i>et al</i> , 2003
FQ1	ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA	<i>qnrB</i>	Jacoby <i>et al</i> , 2006
FQ2	GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT	<i>qnrB</i>	Jacoby <i>et al</i> , 2006
qnrS-fw	TGA TCT CAC CTT CAC CGC TTG	<i>qnrS</i>	Kehrenberg <i>et al</i> , 2006
qnrS-rv	GAA TCA GTT CTT GCT GCC AGG	<i>qnrS</i>	Kehrenberg <i>et al</i> , 2006

Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reacções de sequenciação

Primer	Sequência (5'-3')	Aplicação	Referência
DFRPAT1	TAT GCG GTC GTA ACA CGT TC	Integrões classe 1	Este trabalho
AADA1PAT	AGG TTT CAT TTA GCG CCT CA	Integrões classe 1	Este trabalho
DFRSAL	TGC GGT CGT AAC ACG TTC AAG T	Integrões classe 1	Este trabalho
AADASAL	CCA TAG CGT TAA GGT TTC AT	Integrões classe 1	Este trabalho
OXA613	GGA TTA ACA GAA GCA TGG CT	Integrões classe 1	Este trabalho
ANT(3'')-IA F	GTG GAT GGC GGC CTG AAG CC	Integrões classe 1	Sandvang <i>et al</i> , 1998
CMLA-RF	ATG GGA ATG GGA TGC CTG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
ORFF-F	TAT TCA AAC GGC ATT TAG C	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
QACH-F	GGC TCT TTC TGG CTA TTG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
TNP-F	ATC GAG CTC CTT TGC CAG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
AADA2-F	TAC GTT GTC CCG CAT TTG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
SAT-F	GCA GAT GAT GTG GTT CGC G	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
PSP-F	CGC ATC GCA TGG CAC AAA GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
AADA1-F	ATG AGG GAA GCG GTG ATC GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
AADA1 END F	CAA GGT AGT CGG CAA ATA ATG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
TNP-F2	ATC GAT TGC CGC GCG CAG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
ORF END F	TGG TTC TAA CAT TTC GGT C	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
ORF1	TTA TAC TCC ATA TCT CTC CG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
PSP-F2	CGT GAG CCG ACG TCG ACT GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
ORFF-R	GTA AGC CGA CCG CAG AAT GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
CMLA-R2	ATA GCG GTC CAA ACA AGA GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
QACH-R	AAA CAG CAT AAG CAA TGC CG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
SUL3-R2	TTA CCT AAG AAT GAT TTC CG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
ORF1 END R	TAG CCA AGC CCC TTG CTT GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
SUL3-RR	TCC AAA GCC CTA GGT TAG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
TNP-F3	GCT TAC CAG GCG CAT TTC GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
TNP-R	GCG AAA TGC GCC TGG TAA GC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
SUL3-FR	CGA TTC CAA AAA TCT TGC TC	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
CMLA-F2	ATG AAT CCT TTT GCT CTA CG	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho
PSP-R	CGC ACA AAA TCC GGC ATC G	Integrões classe 1 atípicos	Este trabalho

8) Referências bibliográficas

Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry* 1995; **226**:235-240.

Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**:11-8.

Bischoff KM, White DG, Hume ME, Poole TL, Nisbet DJ. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; **243**:285-291.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). One-Day (24-48h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). PulseNet PFGE Manual, CDC, Atlanta, Georgia, USA, 2002.

DANMAP 2004. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, 2005.

Guerra B., S. Soto, S. Cal, and M.C. Mendoza. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**:2166-2169.

Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist.* 2004; **10**:83-91.

Handwerger S, Skoble J, Discotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; **39**:362-368.

Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**:1178-82.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988; **10**:867-78.

Kado CL, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; **145**:1365-73.

Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **58**:18-22.

Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Moller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulfonamide resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**:513-516.

Lee JC, Oh JY, Cho JW, Park JC, Kim JM, Seol SY, Cho DT. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**:599-604.

Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:185-191.

Matthew M, Harris AM, Marshal MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. Gen Microbiol.* 1975; **88**:169-178.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:1568-1574.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Sixth Edition: Approved Standard M7-A6.* NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement M100-S12.* NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.

Peixe LV, Sousa JC, Perez-Diaz JC, Baquero F. A bla(TEM-1b)-derived TEM-6 beta-lactamase: a case of convergent evolution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; **41**:1206.

Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**:1169-1172.

Pritchett LC, Konkell ME, Gay JM, Besser TE. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:3484-3488.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**:1229-1235.

Sandvang, D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; **160**:37-41.

Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**:2819-2825.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**:2233-2239.

Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**:2242-8.

White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**:2658-2661.

II) Sequências submetidas ao Genbank

1. *Salmonella typhimurium* class 1 integron beta-lactamase (*bla*OXA-30) and aminoglycoside 3'-(9)-O-adenyltransferase (*aadA1*) genes, complete cds (AY534545)

LOCUS AY534545 1965 bp DNA linear BCT 09-AUG-2004
DEFINITION *Salmonella typhimurium* class 1 integron beta-lactamase (*bla*OXA-30) and aminoglycoside 3'-(9)-O-adenyltransferase (*aadA1*) genes, complete cds.
ACCESSION AY534545
VERSION AY534545.1 GI:43468672
KEYWORDS .
SOURCE *Salmonella typhimurium*
ORGANISM *Salmonella typhimurium*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Salmonella*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1965)
AUTHORS Antunes,P., Machado,J., Sousa,J.C. and Peixe,L.
TITLE Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 (beta)-lactamase
JOURNAL J. Antimicrob. Chemother. 54 (2), 429-434 (2004)
PUBMED 15243023
REFERENCE 2 (bases 1 to 1965)
AUTHORS Antunes,P., Machado,J., Sousa,J.C. and Peixe,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (28-JAN-2004) Laboratorio de Microbiologia, Faculdade de Farmacia - Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050, Portugal
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1965
/organism="*Salmonella typhimurium*"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:602"
repeat_region <1..>1965
/mobile_element="integron:class 1"
misc_feature 72..999
/note="OXA-30 gene cassette"
misc_recomb 72..78
/note="OXA-30 recombination core site"
gene 143..973
/gene="blaOXA-30"
CDS 143..973
/gene="blaOXA-30"
/note="oxacillinase"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="beta-lactamase"
/protein_id="AAS46622.1"
/db_xref="GI:43468673"
/translation="MKNTIHINFAIFLIIANIIYSSASASTDISTVASPLFEGTEGCF
LLYDASTNAEIAQFNKAKCATQMAPDSTFKIALSLMAFDAEIIDQKTIFKWDKTPKGM
EIWNSNHTPKTWMQFSVVVWSQEITQKIGLNKIKNYLKDFDYGNDQFSGDKERNNGLT
EAWLESSSLKISPEEQIQFLRKIINHNLVPKNSAIENTIENMYLQDLNSTKLYGKTGA
GFTANRTLQNGWFEGFIISKSGHKYVFVSALTGNLGSNLTSSIKAKKNAITILNTLNL"
misc_recomb 993..999
/note="OXA-30 inverse core site"
misc_recomb 1076..1082

```

gene      /note="aadA1 recombination core site"
1086..1877
/ gene="aadA1"
CDS       1086..1877
/ gene="aadA1"
/ codon_start=1
/ transl_table=11
/ product="aminoglycoside 3'-(9)-O-adenyltransferase"
/ protein_id="AAS46623.1"
/ db_xref="GI:43468674"
/ translation="MREVVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
HSDIDLLVTVTVRLEDETTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAEEELFDPVPEQ
DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLRSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPA
QYQPVILEARQAYLGQEEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_recomb 1879..1885
/ note="aadA1 inverse core site"
misc_recomb 1933..1939
/ note="recombination core site"
ORIGIN
1 gccgtgggct gatgtttgat gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc
61 cctaaaacaa agttgggcca acccgagacc tcattaattg ttagccgtta aaattaagcc
121 ctttaccaaa ccaatactta ttatgaaaaa cacaatacat atcaacttcg ctattttttt
181 aataattgca aatattatct acagcagcgc cagtgcacat acagatatct ctactgttgc
241 atctccatta tttgaaggaa ctgaagggtg ttttttactt tacgatgcat ccacaaacgc
301 tgaaattgct caattcaata aagcaaaagt tgcaacgcaa atggcaccag attcaacttt
361 caagatcgca ttatcactta tggcatttga tgcggaaata atagatcaga aaaccatatt
421 caaatgggat aaaaccccca aaggaatgga gatctggaac agcaatcata caccaaagac
481 gtggatgcaa ttttctgttg tttgggtttc gcaagaaata acccaaaaaa ttggattaaa
541 taaaatcaag aattatctca aagattttga ttatggaaat caagacttct ctggagataa
601 agaaagaaac aacggattaa cagaagcatg gctcgaaagt agcttaaaaa ttccaccaga
661 agaacaaatt caattcctgc gtaaaattat taatcacaaat ctcccagtta aaaactcagc
721 catagaaaac accatagaga acatgtatct acaagatctg gataatagta caaaactgta
781 tgggaaaact ggtgcaggat tcacagcaaa tagaacctta caaacggat ggtttgaagg
841 gtttattata agcaaatcag gacataaata tgtttttgtg tccgcactta caggaaactt
901 ggggtcgaat ttaacatcaa gcataaaagc caagaaaaat gcgatcacca ttctaaacac
961 actaaattta taaaaaatct aatggcaaaa tcgccaacc cttcaatcaa gtcgggacgg
1021 ccaaaaagcaa gcttttggct cccctcgctg gcgctggcg ccccttattt caaacgttaa
1081 acatcatgag ggaagtggcg atcgccgaag tatcgactca actatcagag gtagttggcg
1141 tcatcgagcg ccattctgaa ccgacgttgc tggccgtaca tttgtacggc tccgcagtgg
1201 atggcggcct gaagccacac agtgatattg atttgcgtgt tacggtgacc gtaaggcttg
1261 atgaaacaac gcgcgagct ttgatcaacg accttttga aacttcggct tcccctggag
1321 agagcgagat tctccgcgct gtagaagtca ccattgttgt gcacgacgac atcattccgt
1381 ggcgttatcc agctaagcgc gaactgcaat ttggagaatg gcagcgcaat gacattcttg
1441 caggtatctt cgagccagcc acgatcgaca ttgatctggc tatcttctg acaaaaagcaa
1501 gagaacatag cgttgccctg gtaggtccag cggcggagga actctttgat ccggttctctg
1561 aacaggatct atttgaggcg ctaaatgaaa ccttaacgct atggaaactc ccgcccact
1621 gggctggcga tgagcgaaat gtagtgctta cgttgtcccg catttggtac agcgcagtaa
1681 ccgcaaaaat cgcgcgaag gatgtcgctg ccgactgggc aatggagcgc ctgccggccc
1741 agtatcagcc cgtcatactt gaagctagac aggttatct tggacaagaa gaagatcgct
1801 tggcctcgcg cgcagatcag ttggaagaat ttgttcacta cgtgaaaggc gagatcacca
1861 aggtagtcgg caaataatgt ctaacaattc gttcaagccg acgcccgttc gcggcgcggc
1921 ttaactcaag cgtagatgc actaagcaca taattgctca cagcc

```

2. *Salmonella typhimurium* strain IH184/03 class 1 integron integrase (*intI1*) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (*dfrA12*), putative protein, aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA2*), chloramphenicol-resistance protein (*cmlA1*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds (EF051037)

LOCUS EF051037 7085 bp DNA linear BCT 25-DEC-2006
 DEFINITION *Salmonella typhimurium* strain IH184/03 class 1 integron integrase (*intI1*) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (*dfrA12*), putative protein, aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA2*), chloramphenicol-resistance protein (*cmlA1*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds.
 ACCESSION EF051037
 VERSION EF051037.1 GI:119698196
 KEYWORDS .
 SOURCE *Salmonella typhimurium*
 ORGANISM *Salmonella typhimurium*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Salmonella*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7085)
 AUTHORS Antunes, P. and Peixe, L.
 TITLE Dissemination of *sul3* gene linked to different class 1 integrons associated with a transposon-like structure in *Salmonella* isolates
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 7085)
 AUTHORS Antunes, P. and Peixe, L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, Porto 4050, Portugal
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..7085
 /organism="*Salmonella typhimurium*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="IH184/03"
 /db_xref="taxon:602"
 repeat_region complement(<1..521)
 /note="5' conserved segment"
 /mobile_element="integron:class 1 integron"
 gene complement(<1..379)
 /gene="intI1"
 CDS complement(<1..379)
 /gene="intI1"
 /note="class 1"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="integrase"
 /protein_id="ABL95930.1"
 /db_xref="GI:119698197"
 /translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLPTEQAYVHWVRAFIRFHGVRHPATLGSSEVEAFSLWANERKVSVSTHRQALAALLFFYGKVLCTDLPWLQ"


```

EIGRPRPSRRLPVVLTTPDEVVRIL"
misc_feature 516..1099
              /note="dfrA12 gene cassette"
gene         524..1021
              /gene="dfrA12"
CDS          524..1021
              /gene="dfrA12"
              /note="confers resistance to trimethoprim"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="dihydrofolate reductase"
              /protein_id="ABL95931.1"
              /db_xref="GI:119698198"
              /translation="MNSESVRIYLVAAMGANRVIGNGNIPWKIPGEQKIFRRLTEGK
VVVMGRKTFESIGKPLPNRHTLVISRQANYRATGCVVSTLSHAIALASELGNELYVA
GGAEIYTLALPHAHGVLSEVHQTFEGDAFFPMLNETEFELVSTETIQAVIPYTHSVY
ARRNG"
misc_feature 1100..1419
              /note="orfF gene cassette"
CDS          1133..1423
              /note="orfF"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="putative protein"
              /protein_id="ABL95932.1"
              /db_xref="GI:119698199"
              /translation="MFIQTAFSFGVIQCLFCLFSGRLRLHGLRRFSVFLASSPCVASA
SSYRFCSAVPPRWRSVFSRLAPVAKFKLSVLASGSNISVKPTRILRSAYLAR"
misc_feature 1420..2275
              /note="aadA2 gene cassette"
gene         1429..2220
              /gene="aadA2"
CDS          1429..2220
              /gene="aadA2"
              /note="confers resistance to streptomycin and
spectinomycin"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="aminoglycoside adenylyltransferase"
              /protein_id="ABL95933.1"
              /db_xref="GI:119698200"
              /translation="MREAVTIEISNQLSEVLSVIERHLESTLLAVHLYGSADVGGGLKP
YSDIDLLVTVAVKLDETTRRALLNDLMEASAFPGESETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQ
DLFEALRETLKLWNSQPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAITGKIAPKDVAADWAIKRLPA
QYQPVILLEAKQAYLGQKEDHLASRADHLEEFIRFVKGEIIKSVGK"
misc_feature 2276..3824
              /note="cmlA1 gene cassette"
gene         2297..3741
              /gene="cmlA1"
CDS          2482..3741
              /gene="cmlA1"
              /note="chloramphenicol transporter"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="chloramphenicol-resistance protein"
              /protein_id="ABL95934.1"
              /db_xref="GI:119698201"
              /translation="MSSKNFSWRYSLAATVLLLSPFDLLASLGMDMYLPAVPFMPNAL
GTTASTIQLTLTTYLVMIAGQQLLFGPLSDRLGRRPVLLGGGLAYVVASMGLALTSSA
EVFLGLRILQACGASACLVSTFATVRDIYAGREESNVIYIGILGSMMLAMVPAVGPLLGA
LVDMWLQWRAIFAFGLGMIAASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLY
TLCYAAGMGSGFFVFFSIAPGLMMGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKW
GSPSVLRMGMCCLIAGAVLLAITEIWALQSVLGFIAPMWLVGIGVATAVSVAPNGALR
GFDHVAGTVTAVYFCLGGVLLGSIGTLIIISLLPRNTAWPVVVYCLTLATVVVLGLSCVS
RVKGSRGQGEHDVVALQSAESTSNPNR"
misc_feature 3825..4680
              /note="aadA1 gene cassette"

```

gene 3834..4625
 /gene="aadA1"
CDS 3834..4625
 /gene="aadA1"
 /note="confers resistance to streptomycin and spectinomycin"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="aminoglycoside adenylyltransferase"
 /protein_id="ABL95935.1"
 /db_xref="GI:119698202"
 /translation="MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
 HSDIDLLVTVTVRLEDETTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP
 AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ
 DLFEALNETLTLWNSPDPWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPA
 QYQPVILEARQAYLGGQEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_feature 4681..5191
 /note="qacH gene cassette"
gene 4795..5127
 /gene="qacH"
CDS 4795..5127
 /gene="qacH"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="quaternary ammonium compound-resistance protein"
 /protein_id="ABL95936.1"
 /db_xref="GI:119698203"
 /translation="MKNWLFIAIAIFGEVVATSALKSSHGFTKLVPSSVVVVAGYGLAF
 YFLSLALKSIPVGIAYAVWAGLGIVLVAAIAWIFHGQKLDLWAFVGMGLIVSGVAVLN
 LLSKVSAH"
gene complement (5374..6060)
 /gene="tnp"
CDS complement (5374..6060)
 /gene="tnp"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="transposase"
 /protein_id="ABL95937.1"
 /db_xref="GI:119698204"
 /translation="MLVNPNNPIFNLATGKVLLKVPQVRGMEFYPSKIEKGMRSERAL
 KLAIAEMYVKGVSTRVRSDIVEILCGTEVSSSQVSRKAKELDEEITSWKAQPVGGIQY
 LVLDATYESVRVGSHVVKQALLVAIGVDYSGNRHILDAEVANSEAEVNWRSFLEGLVR
 RGMHGLRMITSDHSGLRRAIDAVFPFILWQRCQFHLQQNAHSYVTKKDEIPLIAADI
 RKVFNRNMSR"
gene complement (6306..>7085)
 /gene="sul3"
CDS complement (6306..>7085)
 /gene="sul3"
 /note="confers resistance to sulfonamide"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="dihydropteroate synthase"
 /protein_id="ABL95938.1"
 /db_xref="GI:119698205"
 /translation="FGIVNITTSFSDGGLYLDTDKAIEHALHLVEDGADVIDLGAAS
 SNPDTEVGVVEEIKRLKPKVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFINDIQGF
 PYPEIYSGLAKSDCKLVLMHSVQRIGAATKVTNPPEEVFTSMMEFFKERIAALVEAGV
 KRERIILDPMGMGFLGSPETSILVLKRFPEIQEAFNLQVMIASRSKSLGKITGTDV
 KSRLAPTLAEMYAYKKGADYLRTHDVKSLSLSDALKISKALG"

ORIGIN

```

1 cgaggatgcg aaccacttca tccgggggtca gcaccaccgg caagcgccgc gacggccgag
61 gtcttccgat ctctgaagc cagggcgagat ccgtgcacag cacttgccg tagaagaaca
121 gcaagggcgc caatgcctga cgatgcgtgg agaccgaaac cttgcgctcg ttgccagacc
181 aggacagaaa tgccctcgact tcgctgctgc ccaaggttgc cgggtgacgc acaccgtgga
241 aacggatgaa ggcacgaacc cagtggacat aagcctgttc ggttggttag ctgtaatgca
301 agtagcgtat gcgctcacgc aactgggtcca gaaccttgac cgaacgcagc ggtggtaacg
361 gcgcagtgcc ggttttcatg gcttggttat actgtttttt tgtacagtct atgcctcggg
421 catccaagca gcaagcgcgt tacgccgtgg gtcgatgttt gatgttatgg agcagcaacg

```

481 atgttacgca gcagggcagt cgcctaaaa caaagtttag catatgaact cggaaatcagt
541 acgcatttat ctcggttctg cgatgggagc caatcggtt attggcaatg gtcctaatat
601 cccctggaaa attccgggtg agcagaagat ttttcgcaga ctactgagg gaaaagtcgt
661 tgtcatgggg cgaaaagcct ttgagtctat cggcaagcct ctaccgaacc gtcacacatt
721 ggtaatctca cgccaagcta actaccgcgc cactggctgc gtagttgttt caacgctgtc
781 gcacgctatc gctttggcat ccgaactcgg caatgaactc tacgtcgagg gcggagctga
841 gatatacact ctggcactac ctacgcccc cggtgtgttt ctatctgagg tacatcaaac
901 cttcgagggt gacgccttct tcccaatgct caacgaaaca gaattcgagc ttgtctcaac
961 cgaaaccatt caagctgtaa ttccgtacac ccactccgtt tatgcgcgtc gaaacggcta
1021 accattccgt caacgggagc ccaaaatgct gcgcattttg gttccctccg ctgcgctccg
1081 gctctcgtaa cgtccaacgt tagcaccact gaaacccagc tttattttagc tcatgtttat
1141 tcaaacggca tttagctttt caggcgttat tcagtgcctg ttttgccctt tttccgggct
1201 tcgctgcat gggctgcgca ggttttcagt ctttttgcc tctagccctt gcgtagcaag
1261 cgcaagcagc tatcgttttt gcagtgtgtt gccgcctcgg tggcgagcgg ttttttcacg
1321 gttagcgccc gtcgcaaat tcaagttatc cgttttggt tctggttcta acatttcggt
1381 caagccgacc cgcattctgc ggtcggctta cctcgccgt tagacatcat gagggaagcg
1441 gtgaccatcg aaatttcgaa ccaactatca gagggtctaa gcgtcattga gcgccatctg
1501 gaatcaacgt tgcgtggcgt gcatttgtac ggctccgcag tggatggcgg cctgaagcca
1561 tacagcgata ttgatttgtt ggttactgtg gccgtaaagc ttgatgaaac gacgcggcga
1621 gcattgctca atgatcttat ggagccttcg gctttccctg gcgagagcga gacgctccgc
1681 gctatagaag tcacccttgt cgtgcatgac gacatcatcc cgtggcggtt tccggctaag
1741 cgcgagctgc aatttgagaa atggcagcgc aatgacattc ttgcgggtat cttcgagcca
1801 gccatgatcg acattgatct agctatcctg cttacaaaag caagagaaca tagcgttgcc
1861 ttggtaggtc cggcagcggg ggaattcttt gacccggttc ctgaacagga tctattcgag
1921 gcgctgaggg aaaccttgaa gctatggaa cgcagcccg actgggcgg cgatgagcga
1981 aatgtagtgc ttacgttgtc ccgcatttgg tacagcgcaa taaccggcaa aatcgcgccg
2041 aaggatgtcg ctgcgactg ggcaataaaa cgcctacctg cccagtatca gccgctctta
2101 cttgaagcta agcaagctta tctgggacaa aaagaagatc acttgccctc acgcgcagat
2161 cacttggaag aatttattcg ctttgtgaaa ggcgagatca tcaagtcagt tggtaaatga
2221 tgtctaaciaa ttcggtcaag ccgaccgcgc tacgcgcggc ggcttaactc cggcgttggg
2281 cgcacaataa ggctccttgc agagtgtgtt gaaagtgtt acgattcaaa tcaatcatg
2341 agatagtcag cagatgagca cttccaagaa cgcagacaag taagccgcag caaccttcat
2401 ttttcggttg ttgcggcgtt ctcatgaatc cttttgctct acgggagcgc cgccaaatcc
2461 tttgttcaag gagatgggtt cgtgagctca aaaaacttta gttggcggtt ctccttgcc
2521 gccacgggtg ttgtgttatc accgttcgat ttattggcat cactcggcag ggacatgtac
2581 ttgccagcag ttccgtttat gccaaacgcg cttggtacga cagcgagcac aattcagctt
2641 acgctgacaa cgtacttgt catgatttgt gccggtcagc tctgttttg accgctatcg
2701 gaccgactgg ggcgcgcgcc cgttctactg ggaggtggc tcgctacgt tgtggcgtca
2761 atgggcctcg ctcttaactg atcggctgaa gtctttctgg ggcttcggat tcttcaggct
2821 tgtggtgct cggcgtgctt tgtttccaca tttgcaacag tacgtgacat ttacgcaggt
2881 cgcgaggaaa gtaatgtcat ttacggcata ctcgatcca tgcgtggcat ggtccggcg
2941 atgtggcctag tgggtattgg tgcgcacaca atgtggctt gggtggcgcc tatcttgcg
3001 tttctagggt tgggcatgat cgtcgtactc gcagcagcgt ggcgattctg gctgaaacc
3061 cgggtgcaac gagttgcggg cttgcaatgg tcgcagctgc tactccccgt taagtgcctg
3121 aacttctggt tgtacacgtt gtgttacgcc gctggaatgg gtagcttctt cgtcttttc
3181 tccattgcgc ccgactaat gatgggcagg caaggtgtgt ctcagcttgg cttcagcctg
3241 ctgttcgcca cagtggcaat tgccatggtg tttacggctc gttttatggg gcgtgtgata
3301 cccaagtggg gcagcccaag tgtcttgcca atgggaatgg gatgcctgat agctggagca
3361 gtattgcttg ccatcaccga aatatgggtt ttgcagtcg ttgtaggctt tattgctcca
3421 atgtggctag tgggtattgg tgcgcacaca gcggtatctg tggcgcccaa tggcgtctt
3481 cgaggattcg accatgttgc tggaaacggtc accgcagctt acttctgctt gggcggtgta
3541 ctgctaggaa gcacgcgaac gttgatcatt tcgctgttgc cgcgcaacac ggcttggccg
3601 gttgtcgtgt actgtttgac cettgcaaca gtctgtctcg gtctgtctt tgtttccga
3661 gtgaagggtc ctgcgcgcca ggggagcat gatgtggctg cgtacaaaag tgcggaaagt
3721 acatcaaatc ccaatcgttg agagaatgtg gcaagctatc gcccaacaaa tcgctgcagc
3781 cgaccacaaa ccgctacgcg gtttcggtcg gctgagctca ggcgttaaac atcatgaggg
3841 aagcgtgat cgccgaagta tcgactcaac tatcagaggt agttggcgtc atcgagcgc
3901 atctcgaaac gacgttgctg gccgtacatt tgtacggctc cgcaggtgat ggcggcctga
3961 agccacacag tgatattgat ttgctggtta cgggtgacct aaggcttgat gaaacaacgc
4021 ggcgagcttt gatcaacgac cttttgaaa cttcggttc cctggagag agcgagattc
4081 tccgcgctgt agaagtcacc attgttgtgc acgacgacat cattccgtgg cgttatccag
4141 ctaagcgcg actgcaattt ggagaatggc agcgcaatga cattcttgca ggtatcttcg
4201 agccagccac gatcgacatt gatctggtta tcttgcgtac aaaagcaaga gaacatagcg
4261 ttgccttgg aggtccagcg gcggaggaac tctttgatcc ggttcctgaa caggatctat
4321 ttgagcgctt aaatgaaacc ttaacgctat ggaactcgcc gcccgctgg gctggcgtg
4381 agcgaaatgt agtgcttac ttgtcccgca tttggtacag cgcagtaacc ggcaaaatcg
4441 cgccgaagga tgcgctgcc gactgggcaa tggagcgct gccggcccg tatcagcccg
4501 tcatacttga agctagacag gcttatcttg gacaagaaga agatcgctt gcctcccgcg

4561 cagatcagtt ggaagaattt gttcactacg tgaaaggcga gatcaccaag gtagtcggca
4621 aataatgtct aacaattcgt tcaagccgac gccgcttcgc ggcgcggtt aactcaagcg
4681 ttagatgcca gatttgccgt tgcgtatgct cacagaaaat cgacagccgc aagactgttt
4741 ttggcaactc atagccacca ctatttatcc ttcataccgt agaggagatt gcacgtgaag
4801 aactggctct ttctggctat tgcaatattt ggtgaggtcg tcgcaacttc cgcactgaag
4861 tccagccatg gattcaccaa gttagttcct tctgtttag ttgtggctgg ctacgggctt
4921 gcgttctatt tctctctct cgcactcaag tccatcccg tcggcattgc ttatgctgtt
4981 tgggctggcc tcggcatcgt acttggtggc gctatcgctt ggatcttcca tggccagaaa
5041 ctagacttgt gggcgcttct tggcatggga cttatcgtaa gtggcgctgc cgttctaaat
5101 ctgctatcca aggtcagcgc acattgatcg ggctggcatc taacagttca ttcaagccga
5161 cgccgcttcg cgccgcggct taattcaggt gttagtcgga cgctacggc gccgaggaaa
5221 aaagaacca aaccattctt gctgccaag agaaaaacc cttacggtgg cgtactggga
5281 aagtgcgtat ctacgacgcc ttgccggtct caatgtcatg ccgtcctctt tcgaaggctg
5341 cttgatgcaa acctctcaa aatctggcat aaactatctt gacatattcc gattgaacac
5401 cttccgaata tcagcggcta tcagcgggat ctcacttttt ttctgacgt aggagtgggc
5461 attctgctgc agatgaaact ggcatcgctt ccacagaatt ccagggaaga cagcatcgat
5521 tgccgcgcgc agtctgagt ggtcatcact ggtgatcatt cgcaggccgt gcacccctcg
5581 tcgtacgaga cctcgagaa aggaacgcca gtttacctct gcctcactgt tcgcgacttc
5641 ggcgtcaaga atatgccgat tcccgtgtta atcaacgcca atagccacta gaagcgctg
5701 cttgaccaca tgggaaccga cgcgaaccga ttcataggtc gcatacaagta ccaagtattg
5761 aatctgtccg acaggctgcg cctccaaga cgtaatctct tcctcgagct cctttgccag
5821 cctgtgacc tgggacgagc tgacttcggt gccacaaaga atttcgacga tatccgagac
5881 cctcgggta cttactcctt tgacatacat ttccgcatg gcgagcttga gagcacgctc
5941 actgcgcatg cctttctcga tgcagctggg ataaaactcc atcccgcgaa cttgtggtac
6001 tttcaagagg actttcccg tcgcaagatt gaatattgga ttatttggat ttaccaacaa
6061 aactactat ttagctacga aaactcaaga gaagtacaca aaaccttttg gaagtgatgg
6121 aagtttaagt cctcttgatt atagtgtagg tatggaacag gtttagaatt aggacatttc
6181 cagtttatgt ttggctatga ttacctctt agtaacagtt cgaaagatcc agacctaaat
6241 caagtacgcc aacacaactt cagagcaagt atagcatatt catttagaaa gctaaaaaaa
6301 taaaactaac ctagggttt ggatattttc aaggcatctg ataaagactt aacatcatgg
6361 gtgcggagat aatctgcacc tttttgtat gcatacattt ctgctgcaag agttggtgct
6421 aaacgagatt tcacatcgg tccagttatt ttacctaga atgatttccg tgacactgca
6481 atcattactt gcaaattaaa agcttcttga atttcaggga aacgcttcaa aacaagaata
6541 gatgtttctg gattagagcc taaaaagaag cccatacccg gatcaagaat aattcgttca
6601 cgctttacac cagcctcaac taaagcagca attctttctt taaaaaatc catcatggaa
6661 gtaaaaacct cttccggtt cgtttcaact ttagtagctg caccaattcg ctgaacggag
6721 tgcataca caagtttgca atctgacttt gccaaagcctg aataaatctc aggataagga
6781 aaaccttgaa tatcattaat aaaatcaacc tttgttcta tgcaaaaact ctgaacctca
6841 ggtttaaatg tatcaacaga aatagaaatg cctttttctt ttaaagcctt aatgacaggt
6901 ttgagtcttt tgatttcttc cacaacgcc acttcagttg tatcaggatt actggaagcg
6961 gctcccaaat caatcacatc tgctccatct tcaaccaa atgcagagcatg ctcaattgcc
7021 ttatctgtat ctaataaaag tctccatcgc gaaaaactat cggtggttat atttacgatt
7081 ccaaa

3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen strain BF128 class 1 integron integrase (*intI1*) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (*dfrA12*), unknown protein, aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA2/I*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds (EF051038)

LOCUS EF051038 4525 bp DNA linear BCT 25-DEC-2006
 DEFINITION *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen strain BF128 class 1 integron integrase (*intI1*) gene, partial cds; dihydrofolate reductase (*dfrA12*), unknown protein, aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA21*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds.
 ACCESSION EF051038
 VERSION EF051038.1 GI:119698206
 KEYWORDS .
 SOURCE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen
 ORGANISM *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Salmonella*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 4525)
 AUTHORS Antunes,P. and Peixe,L.
 TITLE Dissemination of *sul3* gene linked to different class 1 integrons associated with a transposon-like structure in *Salmonella* isolates
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 4525)
 AUTHORS Antunes,P. and Peixe,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Laboratorio de Microbiologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050, Portugal
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..4525
 /organism="*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="BF128"
 /db_xref="taxon:399587"
 repeat_region complement(<1..408)
 /note="5' conserved segment"
 /mobile_element="integron:class 1 integron"
 gene complement(<1..266)
 /gene="intI1"
 CDS complement(<1..266)
 /gene="intI1"
 /note="class 1"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="integrase"
 /protein_id="ABL95939.1"
 /db_xref="GI:119698207"
 /translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLPTEQAYVHWVRAFIRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALAALLF"
 misc_feature 403..986
 /note="dfrA12 gene cassette"

gene 411..908
 /gene="dfrA12"
CDS 411..908
 /gene="dfrA12"
 /note="confers resistance to trimethoprim"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="dihydrofolate reductase"
 /protein_id="ABL95940.1"
 /db_xref="GI:119698208"
 /translation="MNSESVRIYLVAAMGANRVIGNGNIPWKIPGEQKIFRRLTEGK
 VVVMGRKTFESIGKPLPNRHTLVISRQANYRATGCVVSTLSHAIALASELGNELYVA
 GGAEIYTLALPHAHGVLSEVHQTFEGDAFFPMLNETEFELVSTETIQAVIPYTHSVY
 ARRNG"
misc_feature 987..1306
 /note="orfF gene cassette"
CDS 1020..1310
 /note="orfF"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="unknown protein"
 /protein_id="ABL95941.1"
 /db_xref="GI:119698209"
 /translation="MFIQTAFSFGSVIQCLFCLFSGRLRLHGLRRFSVFLASSPCVASA
 SSYRFCSAVPPRWSRVFSRLAPVAKFKLSVLASGSNISVKPTRILRSAYLAR"
misc_feature 1307..2162
 /note="aadA21 gene cassette"
gene 1316..2107
 /gene="aadA21"
CDS 1316..2107
 /gene="aadA21"
 /note="confers resistance to streptomycin and
 spectinomycin"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="aminoglycoside adenylyltransferase"
 /protein_id="ABL95942.1"
 /db_xref="GI:119698210"
 /translation="MREAVTIEISNQLSEVLSVIERHLESTLLAVHLYGSAVDGGLKP
 YSDIDLLVTVAVKLDETTTRALLNDLMEASAFPGESETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYP
 AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ
 DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPA
 QYQPVILEARQAYLGQEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_recomb 1604..1614
 /gene="aadA21"
 /note="crossover junction of aadA2 and aadA1 genes"
misc_feature 2163..2673
 /note="qacH gene cassette"
gene 2277..2609
 /gene="qacH"
CDS 2277..2609
 /gene="qacH"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="quaternary ammonium compound-resistance protein"
 /protein_id="ABL95943.1"
 /db_xref="GI:119698211"
 /translation="MKNWLFLAIAIFGEVVATSALKSSHGFTKLVPVSVVVAGYGLAF
 YFLSLALKSIPVGIAYAVWAGLGIVLVAAIAWIFHGQKLDLWAFVGMGLIVSGVAVLN
 LLSKVSAH"
gene complement (2855..3541)
 /gene="tnp"
CDS complement (2855..3541)
 /gene="tnp"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="transposase"
 /protein_id="ABL95944.1"

```

/db_xref="GI:119698212"
/translation="MLVNPNNPIFNLATGKVLLKVPQVRGMEFYPSKIEKGMRSERAL
KLAIAEMYVKGVSTRRVSDIVEILCGTEVSSSQVSRLAKELDEEITSWKAQPVGQIQY
LVLDATYESVRVGSHVVKQALLVAIGVDYSGNRHILDAEVANSEAEVNWRSFLEGLVR
RGMHGLRMITSDHSGLRRAAIDAVFPGILWQRCQFHLQQNAHSYVTKKDEIPLIAADI
RKVFNRNMSR"
gene      complement (3788..>4525)
          /gene="sul3"
CDS       complement (3788..>4525)
          /gene="sul3"
          /note="confers resistance to sulfonamide"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="dihydropteroate synthase"
          /protein_id="ABL95945.1"
          /db_xref="GI:119698213"
          /translation="GLYLDTDKAIEHALHLEDGADVIDLGAASSNPDTTEVGVVEEI
KRLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFINDIQGFPYPEIYSGLAKSDC
KLVLHMSVQRIGAAATKVTNPPEEVFTSMMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDPGMGFF
LGSNPETSILVLKRFPFIEAFNLQVMIASRSKSLFGKITGTDVKSRLAPTLAAEMYA
YKKGADYLRTHDVKSLSLDAKISKALG"

```

ORIGIN

```

1  ttgaacagca aggcgcgcaa tgctgaagc tgctggaga ccgaaacctt gcgctcggtc
61 gccagccagg acagaaatgc ctgcacttcg ctgtgccca aggttgccg gtgacgcaca
121 ccgtggaaac ggatgaaggc acgaaccagc tggacataag cctgttcggt ttgtaagctg
181 taatgcaagt agcgtatgcg ctcacgcaac tggccagaa ccttgaccga acgcagcggt
241 ggtaacggcg cagtggcggt tttcatggct tggtatgact gttttttgt acagtctatg
301 cctcgggcat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc gatgtttgat gttatggagc
361 agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa agttagccat atgaactcgg
421 aatcagtagc catttatctc gttgctgcga tgggagccaa tcgggttatt ggcaatggtc
481 ctaatatccc ctggaataat ccgggtgagc agaagatttt tcgcagactc actgagggaa
541 aagtcgttgt catggggcga aagacctttg agtctatcgg caagcctcta ccgaaccgtc
601 acacattggt aatctcacgc caagctaact accgcgccac tggctgcgta gttgtttcaa
661 cgctgtcgca cgctatcgct ttggcatccg aactcggcaa tgaactctac gtgcggggcg
721 gagctgagat atacactctg gcactacctc acgcccacgg cgtgtttcta tctgaggtac
781 atcaaacctt cgagggtgac gccttcttcc caatgctcaa cgaacagaa ttcgagcttg
841 tctcaaccga aaccattcaa gctgtaattc cgtacacca ctccgtttat gcgcgtcgaa
901 acggctaacc attccgtcaa cgggacgcca aaatgctgcg cattttgggt ccctccgctg
961 cgctccggtc ctcgttacgt ccaacgttag caccactgaa accagcttt atttagctca
1021 tgtttattca aacggcattt agcttttcag gcgttattca gtgcctggtt tgcccttttt
1081 ccgggcttcg cctgcatggg ctgcgcaggt tttcagctt ttgggctctt agcccttcgc
1141 tagcaagcgc aagcagctat cgtttttgca gtgctgtgcc gccctgggtg ccgacggtt
1201 tttcacggtt agcgcgcgtc gccaaattca agttatcgt tttggttct ggttctaaca
1261 tttcggtcaa gccgaccgcg attctgcggt cggcttacct cggccgttag acatcatgag
1321 ggaagcggtg accatcgaaa tttcgaacca actatcagag gtgctaagcg tcattgagcg
1381 ccatctggaa tcaacgttgc tggccgtgca tttgtacggc tcgcagtggt atggcggcct
1441 gaagccatac agcgatattg atttggttgt tactgtggcc gtaaagcttg atgaaacgac
1501 gcggcgagca ttgctcaatg atcttatgga ggcttcggct tccctggag agagcgagac
1561 gctccgcgct atagaaagtc cccttgctgt gcatgacgac atcattccgt ggcttatcc
1621 agctaaagcg gaactgcaat ttggagaagt gcagcgcaat gacattcttg caggatatct
1681 cgagccagcc acgatcgaca ttgatctggc tatcttgctg aaaaagcaa gagaacatag
1741 cgttgccctg gtaggtccag cggcggagga actctttgat ccggttctct aacaggatct
1801 atttgaggcg ctaaatgaaa ccttaacgct atggaactcg ccgccgact gggtggcgga
1861 tgagcgaaat gtagtgctta cgttgctccg catttggtac agcgagtaa ccggcaaaat
1921 cgcgcggaag gatgtcgctg ccgactgggc aatggagcgc ctgccggccc agtatcagcc
1981 cgtcatactt gaagctagac aggttatctc tggacaagaa gaagatcgct tggcctcccg
2041 cgcagatcag ttggaagaat ttgttacta cgtgaaaggg gagatcacca aggtagtcgg
2101 caaataatgt ctaacaattc gttcaagcgg acgcccgttc gcggcgcggc ttaactcaag
2161 cgttagatgc cagatttggc gttgcgtatg ctcacagaaa atcgacagcc gcaagactgt
2221 ttttggcaac tcatagccac cactatttat ccttcatacc gtagaggaga ttgcacgtga
2281 agaactggct ctttctggct attgcaatat ttggtgaggt cgtcgcaact tccgcaactga
2341 agtccagcca tggattcacc aagttagttc cttctgttgt agttgtggct ggctacgggc
2401 ttgcgttcta tttcctctct ctgcactca agtccatccc ggtcggcatt gcttatgctg
2461 ttgggctgg cctcggcctc gtacttgctg cagctatcgc ttggtatttc catggccaga
2521 aactagactt gtggcggttc gttggcatgg gacttatcgt tagtggcgtc gccgttctaa
2581 atctgctatc caaggtcagc gcacattgat cgggctggca tctaacagtt cattcaagcc
2641 gacgcgcgtt cgcggcgcgg ctttaattcag gtgttagtcg gacgcctacg gcgcggagga
2701 aaaaagaacc aaaccattct tgctgcaaaa gagaaaaacc cttacggtg gcgtactggg

```

2761 aaagtgcgta tctacgacgc cttgccggtc tcaatgtcat gccgtcctct ttcgaaggct
2821 gcttgatgca aacctctcaa aaatctggca taaactatct tgacatatct cgattgaaca
2881 ccttccgaat atcagcggct atcagcggga tctcatcttt tttcgtgacg taggagtggg
2941 cattctgctg cagatgaaac tggcagcgtt gccacagaat tccagggaag acagcatcga
3001 ttgccgcgcg cagtcctgag tggatcatcac tggatgatcat tcgcaggcgg tgcacccctc
3061 gtcgtacgag accctcgaga aaggaaacgcc agtttacctc tgcctcactg ttcgcgactt
3121 cggcgtcaag aatatgccga ttcccgtctg aatcaacgcc aatagccact agaagcgcct
3181 gcttgaccac atgggaaccg acgcgaaccg attcataggt cgcataaggt accaagtatt
3241 gaatctgtcc gacaggctgc gccttccaag acgtaatctc ttcacgagc tcttttgcca
3301 gcctgctgac ctgggacgag ctgacttcgg tgccacaaag aatttcgacg atatccgaga
3361 ccctgcgggt acttactcct ttgacataca tttcggcgat ggcgagcttg agagcacgct
3421 cactgcgcat gcctttctcg atgcagctgg gataaaactc catcccgcga acttgtggta
3481 ctttcaagag gactttcccg gtgcgaagat tgaatatggg attatttggg tttaccaaca
3541 aacactacta tttagctacg aaaactcaag agaagtacac aaaacctttt ggaagtgatg
3601 gaagtttaag tcctcttgat tatagtgtag gtattggaac aggtttagaa ttaggacatt
3661 tccagtttat gtttggctat gattaccctc ttagtaacag ttcgaaagat ccagacctaa
3721 gtcaagtacg ccaacacaaac ttcagagcaa gtatagcata ttcattttaga aagctaaaaa
3781 aataaaaacta acctagggct ttggatattt tcaaggcatc tgataaagac ttaacatcat
3841 ggggtcggag ataactcgca ccttttttgt atgcatacat ttctgctgca agagtgggtg
3901 ctaaacgaga tttcacatcg gttccagtta ttttacctaa gaatgatttc cgtgacactg
3961 caatcattac ttgcaaatta aaagcttctt gaatttcagg gaaacgcttc aaaacaagaa
4021 tagatgtttc tggattagag cctaaaaaga agccataacc cggatcaaga ataattcggt
4081 cacgcctttac accagcctca actaaagcag caattctttc tttaaaaaat tccatcatgg
4141 aagtaaaaac ctcttccgga ttcgtttcaa ctttagtagc tgcaccaatt cgtgaacgg
4201 agtgcacaa cacaagtttg caatctgact ttgccaagcc tgaataaatc tcaggataag
4261 gaaaaccttg aatatcatta ataaaatcaa ccttttggtc tatgcaaaaa ctctgaacct
4321 cagggtttaa tgtatcaaca gaaatagaaa tgcctttttc ttttaaagcc ttaatgacag
4381 gtttgagtct tttgatttct tccacaacgc ccacttcagt tgtatcagga ttactggaag
4441 cggctcccaa atcaatcaca tctgctccat cttcaaccaa atgcagagca tgcacattg
4501 ccttatctgt atctaaataa agtcc

4. *Salmonella typhimurium* strain BF272 class 1 integron, partial sequence; putative esterase (*estX*), phosphoserine phosphatase (*psp*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA2*), chloramphenicol-resistance protein (*cmlA1*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds (EF051039)

LOCUS EF051039 7304 bp DNA linear BCT 25-DEC-2006
 DEFINITION *Salmonella typhimurium* strain BF272 class 1 integron, partial sequence; putative esterase (*estX*), phosphoserine phosphatase (*psp*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA2*), chloramphenicol-resistance protein (*cmlA1*), aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA1*), quaternary ammonium compound-resistance protein (*qacH*), and transposase (*tnp*) genes, complete cds; and dihydropteroate synthase (*sul3*) gene, partial cds.
 ACCESSION EF051039
 VERSION EF051039.1 GI:119698214
 KEYWORDS .
 SOURCE *Salmonella typhimurium*
 ORGANISM *Salmonella typhimurium*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Salmonella*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7304)
 AUTHORS Antunes,P. and Peixe,L.
 TITLE Dissemination of *sul3* gene linked to different class 1 integrons associated with a transposon-like structure in *Salmonella* isolates
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 7304)
 AUTHORS Antunes,P. and Peixe,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-OCT-2006) Laboratorio de Microbiologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050, Portugal
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..7304
 /organism="*Salmonella typhimurium*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="BF272"
 /db_xref="taxon:602"
 repeat_region <1..57
 /note="5' conserved segment"
 /mobile_element="integron:class 1 integron"
 misc_feature 58..1009
 /note="estX gene cassette"
 gene 88..930
 /gene="estX"
 CDS 88..930
 /gene="estX"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="putative esterase"
 /protein_id="ABL95946.1"
 /db_xref="GI:119698215"

```

/translation="MKEKVVVDKAISLYTESFGDPAHEPIILIMGAMSSAVVWPDEFC
SQLAKMGRYVIRYDHRDTGKSTSYEPGQAPYSVEELADDVVRVIDGYGLEAAHLVGMS
LGGFLSQLVALKYPKRVKSLTLIASERLADADPDMPAFDPAIIEYHQRAESLDWSDRD
AVVAYQVGAWRINSTAHAFDAEKIQNIAELNFDRTPNILTTFNHTTLGGGERWLGR
NEIAVPTLIHGTEDPVLPHYVHGLALKDAIRGSKMLTLEGTGHELHHEDWPRIQAIK
QQTS"
gene      1026..1634
          /gene="psp"
CDS       1026..1634
          /gene="psp"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="phosphoserine phosphatase"
          /protein_id="ABL95947.1"
          /db_xref="GI:119698216"
          /translation="MSLALFDFDGTITTRETMPDFVRRSVSRRRLLVGQQLLAPLVLG
          YKIGILSGTLIRRVIVRFAYSGIPASVLEAQGRDFAQSYPNLTGRGEAMQRIAWHKAQ
          GHKVVVVGGLLEAYLEPWCDSHGVELICSSSLQSDGILTGRYEGRQCVLTEKARLVRE
          RYDLATYPTIYAYGDTPEDLMLAIATKQYYQWQEVGVAGGR"
misc_feature 1683..2538
          /note="aadA2 gene cassette"
gene      1692..2483
          /gene="aadA2"
CDS       1692..2483
          /gene="aadA2"
          /note="confers resistance to streptomycin and
          spectinomycin"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="aminoglycoside adenylyltransferase"
          /protein_id="ABL95948.1"
          /db_xref="GI:119698217"
          /translation="MRVAVTIEISNQLSEVLSVIERHLESTLLAVHLYGSAVDGGLKP
          YSDIDLLVTAVKLDETTTRALLNDLMEASAFPGESETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYP
          AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEFFDPVPEQ
          DLFEALRETLKLWNSQPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAITGKIAPKQVAAADWAIKRLPA
          QYQPVLLLEAKQAYLGQKEDHLASRADHLEEFIRFVKGEIISKVSGK"
misc_feature 2539..4087
          /note="cmlA1 gene cassette"
gene      2560..4004
          /gene="cmlA1"
CDS       2745..4004
          /gene="cmlA1"
          /note="chloramphenicol transporter"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="chloramphenicol-resistance protein"
          /protein_id="ABL95949.1"
          /db_xref="GI:119698218"
          /translation="MSSKNFSWRYSLAATVLLSPFDLLASLGMDMYLPAVPFMPNAL
          GTTASTIQLTLTTYLVMIAGAGQLLFGPLSDRLGRRPVLLGGGLAYVVASMGALATSSA
          EVFLGLRILQACGASACLVSTFATVRDIYAGREESNVIYGILGSMAMVPAVGPLLGA
          LVDMWLGWRAIFAFGLGMIAASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLY
          TLCYAAGMGSFVFFSIAPGLMMGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKW
          GSPSVLRMGMGCLTAGAVLLAITEIWALQSVLGFAPMWLVGIGVATAVSVAPNGALR
          GFDHVAGTVTAVYFCLGGVLLGSIGTLIISLLPRNTAWPVVVYCLTLATVVVLGLSCVS
          RVKGSRGQGEHDVVALQSAESTSNPNR"
misc_feature 4088..4943
          /note="aadA1 gene cassette"
gene      4097..4888
          /gene="aadA1"
CDS       4097..4888
          /gene="aadA1"
          /note="confers resistance to streptomycin and
          spectinomycin"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="aminoglycoside adenylyltransferase"

```

```

/protein_id="ABL95950.1"
/db_xref="GI:119698219"
/translation="MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
HSDIDLLVTVTVRLDETTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ
DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAAADWAMERLPA
QYQPVILEARQAYLGQEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_feature 4944..5454
               /note="qacH gene cassette"
gene          5058..5390
               /gene="qacH"
CDS           5058..5390
               /gene="qacH"
               /codon_start=1
               /transl_table=11
               /product="quaternary ammonium compound-resistance protein"
/protein_id="ABL95951.1"
/db_xref="GI:119698220"
/translation="MKNWLFLAIAIFGEVVATSALKSSHGFTKLVPVSVVVVAGYGLAF
YFLSLALKSIPVGIAYAVWAGLGIVLVAATAWIFHGQKLDLWAFVGMGLIVSGVAVLN
LLSKVSAH"
gene          complement (5637..6323)
               /gene="tnp"
CDS           complement (5637..6323)
               /gene="tnp"
               /codon_start=1
               /transl_table=11
               /product="transposase"
/protein_id="ABL95952.1"
/db_xref="GI:119698221"
/translation="MLVNPNNPIFNLATGKVLLKVPQVRGMEFYFPCIEKGMRSERAL
KLAIAEMYVKGVSTRVSDIVEILCGTEVSSSQVSRALAKELDEEITSWKAQPVGQIQY
LVLDATYESVRVGSHVVKQALLVAIGVDYSGNRHILDAEVANSEAEVNWRSFLEGLVR
RGMHGLRMITSDHSGLRAAIDAVFPFILWQRCQFHLQQNAHSYVTKKDEIPLIAADI
RKVFNRNMSR"
gene          complement (6570..>7304)
               /gene="sul3"
CDS           complement (6570..>7304)
               /gene="sul3"
               /note="confers resistance to sulfonamide"
               /codon_start=1
               /transl_table=11
               /product="dihydropteroate synthase"
/protein_id="ABL95953.1"
/db_xref="GI:119698222"
/translation="LYLDTDKAIEHALHVEDGADVIDLGAASSNPDTEVGVEEIK
RLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFINDIQGFPYPEIYSGLAKSDCK
LVLHMSVQRIGAAATKVETNPPEVFTSMMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDPGMGFFL
GSNPETSILVLKRFPEIQEAFNLQVMIASVRKSFLGKITGTDVKSRLAPTLLAEMYAY
KKGADYLRTHDVKSLSDALKISKALG"

```

ORIGIN

```

1  ttgatgttat  ggagcagcaa  cgatgttacg  cagcagggca  gtcgccctaa  aacaaagttg
61  tacgtagaac  tcgaaggcaa  ttaagtatg  aaagaaaagg  tagttggtga  taaagcgatt
121 tcaactctata  ccgaatcatt  cggcgaccg  gcccatgaac  ccattattct  gatcatgggg
181 gcaatgtcgt  ctgcggtgtg  gtggcctgat  gagttttgtt  cccaacttgc  caaaatgggt
241 cgctatgtga  tccggtacga  ccaccgtgat  accgggaaat  caacaagcta  tgagccaggt
301 caggctccat  attccgttga  agaattagca  gatgatgttg  ttcgcgtcat  tgatggttat
361 ggtctggaag  ctgctcattt  agtcggcatg  tctttggggg  gatttctttc  ccagcttgta
421 gctctcaagt  atccgaacg  tgtgaagagc  ttgacgtga  ttgcttcaga  acggtctgca
481 gatgcagatc  cggatatgcc  cgcttttgat  cctgccatca  ttgagtatca  ccaacgggcg
541 gaatcgctgg  attggtctga  tagagatgct  gtcgtcgctg  atcaggctcg  agcgtggcga
601 atcaactcag  gtactgcgca  tgcttttgac  gctgagaaga  tacaaaacat  cgctgagtta
661 aattttgatc  gcactccgaa  tctctgaca  acattcaacc  aactactttt  aggtggtggc
721 gagagatggc  tcgggagatt  aaatgagata  gctgtaccaa  ctttgatcat  tcacggcacg
781 gaggatcctg  tacttcctta  tgtgcatggg  ttggcactga  aagatgcgat  tcgtggttca
841 aaaatgctga  cactcgaagg  cacgggacat  gagttgcata  atgaagactg  gccgaggatt
901 atccagcgca  ttaaggggca  aacgtcatag  ctatcggttg  caccgtacaa  caagttgctg
961 caccggaaaa  attactcgct  gcgctcgcaa  ttttcgggtg  agcaaggcgt  tagcgcccac

```

1021	aacgcatgtc	tctcgcactc	tttgacttcg	atggcacaa	taccactcgc	gagacgatgc
1081	cggattttgt	gcggcgggtcc	gtgagccgac	gtcgactgct	tgtgggacaa	ctgcttctgg
1141	cgccgctcgt	gcttgggtat	aagattggga	tcttgtctgg	cacctgatc	cgtcgcgtca
1201	tcgttcgctt	cgcttacagc	ggcatcccgg	cctcggtcct	ggaggcccaa	ggtcgtgact
1261	tcgctcagag	ctacctgccc	aataccctcc	gcggcgaggc	aatgcagcgc	atcgcatggc
1321	acaaagcgca	ggggcacaag	gttgtcgttg	tttcggcgcg	acttgaggct	tacttgagagc
1381	cgtggtgcga	ctcgacgggc	gttgagctca	tctgttcttc	cttgcaacag	tcggacggaa
1441	tcctaaccggg	ccgctatgaa	gggcggcagt	gcgtcttgac	ggagaaggct	cgcttgggtcc
1501	gtgagcgcta	cgacctggcg	acatatccga	ccatctacgc	gtacggagac	acgccggagg
1561	acctggatat	gctggccatt	gctactaagc	agtactatca	gtggcaagag	gttgcgctcg
1621	cagtgggcg	ctaacaagtc	attcaagccg	acgccgcttc	gcggcgcggc	ttaattctgg
1681	tgtagacat	catgagggta	gcggtgacca	tcgaaatttc	gaaccaacta	tcagagggtgc
1741	taagcgtcat	tgagcgccat	ctggaatcaa	cgttgctggc	cgtgcatttg	tacggctccg
1801	cagtggatgg	cgccctgaag	ccatacagcg	atattgattt	gttggttact	gtggccgtaa
1861	agcttgatga	aacgacggcg	cgagcattgc	tcaatgacct	tatggaggct	tcggtttcc
1921	ctggcgagag	cgagacgctc	cgcgctatag	aagtcaccct	tgtcgtgcat	gacgacatca
1981	tcccgtggcg	ttatccggct	aagcgcgagc	tgcaatttgg	agaatggcag	cgcaatgaca
2041	ttcttgccgg	tatcttcgag	ccagccatga	tcgacattga	tctagctatc	ctgcttacia
2101	aagcaagaga	acatagcggt	gccttggtag	gtccggcagc	ggaggaaatc	tttgaccggg
2161	ttcctgaaca	ggatctattc	gagggcgctga	gggaaacctt	gaagctatgg	aactcgcagc
2221	ccgactgggc	cggcgatgag	cgaaatgtag	tgcttacggt	gtcccgcatt	tggtacagcg
2281	caataaccgg	caaaatcgcg	ccgaaggatg	tcgctgccga	ctgggcaata	aaacgcctac
2341	ctgcccagta	tcagcccgtc	ttacttgaag	ctaagcaagc	ttatctggga	caaaaagaag
2401	atcacttggc	ctcacgcgca	gatcacttgg	aagaatttat	tcgctttgtg	aaaggcgaga
2461	tcacaaagtc	agttggtaaa	tgatgtctaa	caattcggtc	aagccgaccg	cgctacgcgc
2521	ggcggttaa	ctccggcggt	gggcgcacaa	taaggctcct	tcgagagttg	cttgaaagtt
2581	gttacgattc	aaattcaatc	atgagatagt	cagcagatga	gcacttccaa	gaacgcagac
2641	aagtaagccg	cagcaacctt	catttttccg	ttgttgccgc	gttctcatga	atccttttgc
2701	tctacgggag	cgccgccaaa	tcctttgttc	aaggagatgg	tttcgtgagc	tcaaaaaact
2761	ttagtggcg	gtactccctt	gcgcgccagg	tgttgttgtt	atcaccgctc	gatttattgg
2821	ctacactcgg	catggacatg	tacttgccag	cagtgccgtt	tatgccaaac	gcgcttggta
2881	cgacagcgag	cacaattcag	cttacgctga	caacgtactt	ggtcatgatt	ggtgccggtc
2941	agctcttgtt	tggaaccgta	tcggaccgac	tggggcgccg	ccccgttcta	ctgggaggtg
3001	gcctcgccta	cgttgtggcg	tcaatgggcc	tcgctcttac	gtcatcggtc	gaagcttttc
3061	tggggcttcg	gattcttcag	gcttgtgttg	cctcggcggt	ccttgtttcc	acatttgcaa
3121	cagtacgtga	catttacgca	ggtcgcgagg	aaagtaatgt	catttacggc	atactcggat
3181	ccatgctggc	catgggtccc	gcggtaggcc	cattgctcgg	agcgctcgtc	gacatgtggc
3241	ttgggtggcg	ggctatcttt	gcgtttctag	gtttgggcat	gatcgctgca	tctgcagcag
3301	cgtggcgatt	ctggcctgaa	accggggtgc	aacgagttgc	gggcttgcaa	tggtcgcagc
3361	tgctactccc	cgtaagtgc	ctgaacttct	ggttgtacac	gttgtgttac	gccgctggaa
3421	tgggtagctt	cttcgtcttt	ttctccattg	cgcccgact	aatgatgggc	aggcaagggtg
3481	tgtctcagct	tggcttcagc	ctgctgttcg	ccacagtggc	aattgccatg	gtgtttacgg
3541	ctcgttttat	ggggcggtg	atacccaagt	ggggcagccc	aagtgtcttg	cgaatgggaa
3601	tgggatgect	gatagctgga	gcagtattgc	ttgccatcac	cgaaatatgg	gctttgcagt
3661	ccgtgttagg	ctttattgct	ccaatgtggc	tagtgggtat	tgggtgcgcc	acagcggtat
3721	ctgtggcgcc	caatggcgct	cttcgaggat	tcgaccatgt	tgctggaacg	gtcacggcag
3781	tctacttctg	cttgggcggg	gtactgctag	gaagcatcgg	aacgttgatc	atttcgctgt
3841	tgcgcgcgaa	cacggcttgg	ccggttgtcg	tgtactgttt	gacccttgca	acagtcgtgc
3901	tcggtctgtc	ttgtgtttcc	cgagtgaagg	gctctcgcgg	ccagggggag	catgatgtgg
3961	tcgcgctaca	aagtgcggaa	agtacatcaa	atcccaatcg	ttgagagaat	gtggcaagct
4021	atcgcccaac	aaatcgctgc	agccgaccca	aaaccgctac	gcggtttcgg	tcggctgagc
4081	tcaggcggtta	aacatcatga	gggaagcggt	gatcgccgaa	gtatcgactc	aactatcaga
4141	ggtagtggc	gtcatcgagc	gccatctcga	accgacgttg	ctggccgtac	atttgtacgg
4201	ctccgcagtg	gatggcgggc	tgaagccaca	cagtgatatt	gatttgctgg	ttacgggtgac
4261	cgtaaggtct	gatgaaacaa	cgcggcgagc	tttgatcaac	gaccttttgg	aaacttcggc
4321	ttcccctgga	gagagcgaga	ttctccgcgc	tgtagaagtc	accattgttg	tgcacgacga
4381	catcattccg	tggcgttatc	cagctaagcg	cgaactgcaa	tttgagaaat	ggcagcgcaa
4441	tgacattctt	gcaggatatc	tcgagccagc	cacgatcgac	attgatctgg	ctatcttgc
4501	gacaaaagca	agagaacata	gcgttgccct	ggtaggtcca	gcgccggagg	aactctttga
4561	tcctggttcc	gaacaggatc	tatttgagcg	gctaaatgaa	accttaacgc	tatggaaactc
4621	gcccggcgac	tgggctggcg	atgagcgaaa	tgtagtgtct	acgttgtccc	gcatttggta
4681	cagcgcgagta	accggcaaaa	tcgcgcggaa	ggatgtcgct	gccgactggg	caatggagcg
4741	cctgccggcc	cagtatcagc	ccgtcatact	tgaagctaga	caggcttatc	ttggacaaga
4801	agaagatcgc	ttggcctcgc	gcgcagatca	gttggaagaa	tttggtcact	acgtgaaggg
4861	cgagatcacc	aaggtagtcg	gcaaataatg	tctaacaatt	cgttcaagcc	gacgccgctt
4921	cgcggcggcg	cttaactcaa	gcgttagatg	ccagatttgg	cgttgcgat	gctcacagaa
4981	aatcgacagc	cgcaagactg	tttttggcaa	ctcatagcca	ccactattta	tccttcatac
5041	cgtagaggag	attgcacgtg	aagaactggc	tctttctggc	tattgcaata	tttgggtgag

5101 tcgtcgcaac ttccgcactg aagtcacgac atggattcac caagttagtt ccttctgttg
5161 tagttgtggc tggctacggg ctgtcggttct atttctctc tctcgactc aagtcacatc
5221 cggtcggcat tgcttatgct gtttgggctg gcctcgcat cgtacttggt gcagctatcg
5281 cttggatctt ccatggccag aaactagact tgtgggctt cgttggcatg ggacttatcg
5341 ttagtggcgt cgccgttcta aatctgctat ccaaggtcag cgcacattga tggggtggc
5401 atctaacagt tcattcaagc cgacgcgct tgcggcgcg gcttaattca ggtgttagtc
5461 ggacgcctac ggcgcgaggg aaaaaagaaa ccaaaccatt cttgctgcca aagagaaaaa
5521 ccccttacgg tggcgtagtg ggaaagtgcg tatctacgac gccttgccgg tctcaatgtc
5581 atgcgctcct ctttcgaagg ctgcttgatg caaacctctc aaaaatctgg cataaactat
5641 cttgacatat tccgattgaa caccttcgga atatcagcg ctatcagcg gatctcatct
5701 tttttcgtga cgtaggagtg ggcattctgc tgcagatgaa actggcagcg ttgccacaga
5761 attccaggga agacagcatc gattgcccgc cgcagtcctg agtggtcac actggtgatc
5821 attcgcaggc cgtgcatccc tcgtcgtacg agaccctcga gaaaggaac ccagtttacc
5881 tctgctcac tgctcgacac ttccggctca agaatatgcc gattccgct gtaatcaacg
5941 ccaatagcca ctagaagcgc ctgcttgacc acatgggaac cgacgcgaac cgattcatag
6001 gtgcgcatcaa gtaccaagta ttgaatctgt ccgacaggct ggccttcca agacgtaatc
6061 tcttcacga gctcctttgc cagcctgctg acctgggacg agctgacttc ggtgccaca
6121 agaatttcga cgatatccga gacctgccc gtacttactc ctttgacata ctttcggcg
6181 atggcgagct tgagagcacg ctcaactgccc atgcctttct cgtgcagct gggataaac
6241 tccatccgc gaacttggtg tactttcaag aggactttcc cggtcgcaag attgaatatt
6301 ggattatttg gatttaccac caaacactac tatttagcta cgaaaactca agagaagtac
6361 acaaacctt ttggaagtga tgggaagtta agtcctctg attatagtgt aggtattgga
6421 acaggtttag aattaggaca tttccagttt atgtttgct atgattacc tcttagtaac
6481 agttcgaaag atccagacct aagtcaagta cgccaacaca acttcagagc aagtatagca
6541 tattcattta gaaagctaaa aaaataaaac taacctaggg ctttgatatt tttcaaggca
6601 tctgataaag acttaacatc atgggtgccc agataatctg cacctttttt gtatgcatac
6661 atttctgctg caagagttgg tgctaaacga gatttcacat cggttccagt tattttacct
6721 aagaatgatt tccgtgacac tgcaatcatt acttgcaaat taaaagcttc ttgaatttca
6781 gggaaacgct tcaaaacaag aatagatgtt tctggattag agcctaaaaa gaagcccata
6841 cccggatcaa gaataattcg ttcacgcttt acaccagcct caactaaagc agcaattctt
6901 tctttaaaaa attccatcat ggaagtaaaa acctcttccg gattcgtttc aactttagta
6961 gctgcaccaa ttogctgaac ggagtgcac aacacaagtt tgcaatctga ctttgccaag
7021 cctgaataaa tctcaggata aggaaaacct tgaatatcat taataaaatc aaccttttgt
7081 tctatgcaaa aactctgaac ctcaggttta aatgtatcaa cagaaataga aatgcctttt
7141 tcttttaaag ccttaatgac aggtttgagt cttttgattt cttccacaac gccacttca
7201 gttgtatcag gattactgga agcggctccc aatcaatca catctgctcc atcttcaacc
7261 aaatgcagag catgctcaat tgccttatct gtatctaaat aaag

